

DIE AMINOSÄURESEQUENZ
DER FUNKTIONELLEN EINHEIT d
AUS DEM β c-HÄMOCYANIN
DER WEINBERGSCHNECKE
HELIX POMATIA

Raimund Drexel

DIE AMINOSÄURESEQUENZ DER
FUNKTIONELLEN EINHEIT α
AUS DEM β -HAMOCYANIN DER
WEINBERGSCHNECKE
HELIX POMATIA

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der

Fakultät für Biologie

der

Ludwig - Maximilians - Universität

München

vorgelegt von Raimund Drexel

aus Augsburg

Juli 1986

1. Gutachter: Prof. Dr. Bernt *LINZEN*

2. Gutachter: Priv. Doz. Dr. H.-J. *SCHNEIDER*

Tag der mündlichen Prüfung: 29. 7. 1986

DISSERTATIONS- UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit wurde am Zoologischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Bernt *LINZEN* durchgeführt.

Besonders danken möchte ich Herrn Prof. Dr. Bernt *LINZEN* für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, sein stetes Interesse und seine Bereitschaft zu anregenden Diskussionen.

Herrn Dr. Hans-Jürgen *SCHNEIDER* danke ich sehr herzlich für angenehme, freundschaftliche Zusammenarbeit.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Dr. Walter *SCHARTAU* für die Durchführung der Aminosäureanalysen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Friedrich *LOTTSPEICH* und Herrn Josef *KELLERMANN* für die automatische Sequenzierung der Peptide und computerisierte Verarbeitung der Aminosäuresequenz.

Herrn Prof. Dr. Constant *GIELENS* aus der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. René *LONTIE* an der katholischen Universität Leuven danke ich sehr für die Versorgung mit funktioneller Einheit *d* in ausgezeichneter und gleichbleibender Qualität.

Ferner danke ich besonders herzlich allen Mitarbeitern der Abteilung für ihre Hilfsbereitschaft und die freundschaftliche Atmosphäre.

INHALTSVERZEICHNIS

EINLEITUNG	1
MATERIAL UND METHODEN	8
1. Chemikalien	8
2. Isolierung der funktionellen Einheit d	9
3. Proteinbestimmung	9
4. Dialysen und Entsalzungen	9
5. Denaturierung und Carboxymethylierung	10
6. Chemische Proteolysemethoden	10
a. Spaltung mit Bromcyan	10
b. Spaltung mit Säure	11
7. Enzymatische Proteolysemethoden	11
a. Spaltung mit Trypsin	11
b. Spaltung mit Chymotrypsin	11
c. Spaltung mit <i>Staphylococcus aureus</i> V 8 Protease	11
d. Spaltung mit Endoproteinase Lys-C aus <i>Lysobacter enzymogenes</i>	12
8. Analytische SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	12
9. Gelfiltrationen	12
10. Hochdruckflüssigkeitschromatographie	13
a. Gelfiltration	13
b. Reversed-phase HPLC im TFA-System	13
c. Reversed-phase HPLC im Acetat-System (KRATZIN et al., 1980)	14
11. Aminosäureanalysen	14
12. Bestimmung der Aminosäuresequenzen	14
a. Manuelle Sequenzierung	14
b. Automatische Sequenzierung	15
13. Automatische Sequenzierung nach Blockierung mit <i>o</i> -Phtaldialdehyd	15
14. Bestimmung des C-Terminus	15
15. Berechnung des Hydrophilizitätsprofils	16
16. Vorhersage der Sekundärstruktur	16
ERGEBNISSE	17
I. Sequenzierungsstrategie	17
II. Trennung des Peptidgemisches der funktionellen Einheit d	17
III. Strukturaufklärung des Fragments d 1	20

1. Spaltung des Fragments d 1 mit Bromcyan	20
2. Spaltung des Fragments d 1 mit Trypsin	28
3. Spaltung des Fragments d 1 mit der Protease aus <i>S. aureus</i>	40
4. Isolierung des Peptids T 11 aus der zweiten Spaltung des Fragments d 1 mit Trypsin	49
5. Spaltung des Fragments d 1 mit Säure und mit Chymotrypsin	52
6. Die beiden letzten Lücken im Fragment d 1	58
a. Spaltung des Fragments d 1 mit der Endoproteinase Lys-C aus <i>Lysobacter enzymogenes</i>	58
b. Die letzte Lücke in Fragment d 1	59
 IV. Strukturaufklärung des Fragments d 2	 63
1. Spaltung des Fragments d 2 mit Trypsin	63
2. Spaltung des Fragments d 2 mit Chymotrypsin	65
3. Spaltung des Fragments d 2 mit der Protease aus <i>S. aureus</i>	69
4. Spaltung des Fragments d 2 mit Bromcyan zur Klärung offener Positionen	70
5. Bestimmung des C-Terminus von d 2	73
 V. Die Verknüpfung der Fragmente d 1 und d 2	 75
1. Versuch zur Isolierung eines überlappenden Peptids	75
2. Spaltung von Fragment P 2 mit Bromcyan und Chymotrypsin	78
 DISKUSSION	 82
1. Sequenzierungsstrategie	82
2. Charakteristika der Gesamtsequenz	84
3. Vergleich der Sequenz von <i>Helix d</i> mit Arthropoden- hämocyaninen	92
4. Vergleich mit anderen kupferhaltigen Proteinen	94
5. Vergleich mit Teilsequenzen von Hämocyanin aus <i>Paroctopus dofleini</i>	100
6. Folgerungen für die Evolution der Hämocyanine	102
 ZUSAMMENFASSUNG	 105
 LITERATURVERZEICHNIS	 107

ABKÜRZUNGEN

Aminosäuren:

A	Alanin	M	Methionin
C	Cystein	N	Asparagin
D	Asparaginsäure	P	Prolin
E	Glutaminsäure	Q	Glutamin
F	Phenylalanin	R	Arginin
G	Glycin	S	Serin
H	Histidin	T	Threonin
I	Isoleucin	V	Valin
K	Lysin	W	Tryptophan
L	Leucin	Y	Tyrosin
X	nicht bestimmte Aminosäure	I/L	Isoleucin oder Leucin
R;	Peptidende	A-	Peptid länger als sequenziert

Peptide aus Spaltungen mit:

CB	Bromcyan	AC	Säure
T	Trypsin	Ch	Chymotrypsin
SP	Protease aus <i>Staphylococcus aureus</i> V 8		
K	Endoproteinase Lys-C aus <i>Lysobacter enzymogenes</i>		
D	Dalton (Molekulargewichtseinheit)		
DABITC	4-Dimethylaminoazobenzol-4-isothiocyant		
DABTH	4-Dimethylaminoazobenzol-4-thiohydantoin		
EDTA	Ethyldiamintetraacetat		
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie		
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese		
PTH	Phenylthiohydantoin		
OPA	α -Phthaldialdehyd		
SDS	Natriumdodecylsulfat		
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin		
TFA	Trifluoressigsäure		
TPCK	L-(1-Tosylamido-2-phenyl)ethyl-chloridmethylketon		

EINLEITUNG

Vor mehr als 300 Jahren wurde zum ersten Mal die blaue Farbe des Blutes einer Schnecke beschrieben (SWAMMERDAM, 1669). Die Funktion des blauen Blutfarbstoffes, der im 19. Jahrhundert bei verschiedenen Vertretern der Arthropoden und Mollusken entdeckt wurde, erkannte FREDERICQ (1878). Er nannte den Farbstoff, der bei Sauerstoffbindung reversibel blau wird und als Sauerstofftransporteur dient, Hämocyanin. FREDERICQ fand, daß dieses Hämocyanin ein Protein ist und Kupferatome enthält (LONTIE, 1977).

Mit diesen Erkenntnissen sind schon einige der wichtigsten Eigenschaften der Hämocyanine beschrieben. Weitere Arbeiten zeigten die Absorptionsspektren des Hämocyanins im beladenen und unbeladenen Zustand. Bei Sauerstoffbeladung treten Maxima bei 570 nm, der blauen Farbe, und im nahen Ultraviolett bei etwa 340 nm auf. Bei Abgabe des Sauerstoffs verschwinden diese Maxima. Das Verhältnis der gebundenen Sauerstoffmoleküle zu den im Hämocyanin enthaltenen Kupferatomen wurde als 1 : 2 bestimmt (REDFIELD, 1934).

Innerhalb des Stammes der Mollusken konnte Hämocyanin bei Vertretern der Klassen Gastropoda, Cephalopoda, Amphineura und nach einer kürzlich veröffentlichten Arbeit (MORSE, et al., 1986) auch bei Bivalvia entdeckt werden, so daß nur in der Klasse Scaphopoda bisher kein Hämocyanin festgestellt werden konnte. Im Stamm der Arthropoden enthalten Vertreter der Klassen Chelicerata, Crustacea und Myriapoda Hämocyanin. Hämocyanin kommt in der Hämolymphe dieser Tier immer frei gelöst, außerhalb von Zellen, vor.

Die geschilderten Eigenschaften sind charakteristisch für alle Hämocyanine. Untersuchungen der Tertiär- und Quartärstruktur der Hämocyanine aus den beiden Stämmen Mollusca und Arthropoda zeigten jedoch einen sehr unterschiedlichen Aufbau. (Reviews: VAN HOLDE & MILLER, 1982; ELLERTON et al., 1983). Die Arthropodenhämocyanine bestehen aus Untereinheiten mit Molekulargewichten von etwa 75000 D, die sich nach alkalischer Dissoziation gewinnen lassen. Sie enthalten jeweils zwei Kupferatome, welche ein Molekül Sauerstoff binden. Die Untereinheiten sind in Hexameren organisiert, die artspezifisch zu größeren Strukturen zusammentreten können, wobei sich Oligomere von 2, 4 und 8 Hexameren bilden. Die verschiedenen Strukturen lassen sich durch ihre Sedimentationskonstanten unterscheiden und sind im Elektronenmikroskop sichtbar. Die Hämocyanine von verschiedenen Arthropoden haben je nach Zahl der Hexamere Molekulargewichte von 450000 bis 3,5 Mio D. Die

Untereinheiten sind heterogen und lassen sich elektrophoretisch auftrennen. Mit einer Kombination von immunologischen Methoden und der Elektronenmikroskopie ließ sich feststellen, daß die einzelnen Untereinheiten im Gesamt-molekül definierte Plätze einnehmen (LAMY et al., 1981, MARKL et al., 1981,). Die Eigenschaften der Untereinheiten beruhen auf Unterschieden in der Aminosäuresequenz. Die ersten Primärstrukturen von Hämocyaninen wurden mit den Untereinheiten d und e des Hämocyanins der Vogelspinne *Eurypelma californicum* (SCHARTAU et al., 1983; SCHNEIDER et al., 1983; EYERLE & SCHARTAU, 1985) ermittelt. Mittlerweile konnten Untereinheiten aus verschiedenen Arthropoden sequenziert werden (NEMOTO & TAKAGI, 1983; BAK et al., 1986). Die Struktur der Arthropodenhämocyanine konnte durch die Ermittlung der Sekundär- und Tertiärstruktur des Hämocyanins der Garnele *Panulirus interruptus* (GAYKEMA et al., 1984) weiter aufgeklärt werden. Da die Primärstrukturen der Untereinheiten aus unterschiedlichen Arten sich stark ähneln und sich homologisieren lassen, konnte man die Tertiärstruktur von *Panulirus* Hämocyanin auf andere Hämocyanine übertragen und Schlüsse auf die besonders interessanten Bereiche der Kupferbindung ziehen (LINZEN et al., 1985).

Bei der Sequenzierung der Untereinheit e des Hämocyanins der Vogelspinne *Eurypelma californicum* war ein Peptid aufgefallen, das durch seine Histidinreiche Sequenz (H-H-W-H-W-H) als Teil des kupferbindenden Zentrums angesehen wurde und das auch bei anderen Arthropoden auftritt (SCHNEIDER et al., 1982). Durch die Aufklärung der Tertiärstruktur von *P. interruptus* Hämocyanin konnten später sechs Histidinreste als Liganden des Kupfers identifiziert werden. Je drei Histidinreste, darunter die beiden oben unterstrichenen, binden ein Kupferatom.

Die Struktur der Molluskenhämocyanine unterscheidet sich grundlegend von der der Arthropodenhämocyanine. Der Kupfergehalt ist, bezogen auf das Molekulargewicht, höher: zwei Kupferatome auf 50000 D Protein. Bei Versuchen mit der analytischen Ultrazentrifuge und Bestimmung der Sedimentationskonstanten waren schon vor 50 Jahren die hohen S-Werte aufgefallen (ERIKSSON-QUENSEL & SVEDBERG, 1936). Das Hämocyanin von Vertretern der Gastropoden hat Sedimentationskonstanten von etwa 100 S, während die Vertreter der Cephalopoden Hämocyanin mit etwa 60 S besitzen. Diese hochmolekularen Proteine lassen sich in alkalischer Lösung in kleinere Komponenten dissoziieren. Es treten Moleküle mit 60 S, 19 S und 11 S auf. Die 11 S-Komponente läßt sich mit denaturisierenden Agenzien nicht mehr weiter in Untereinheiten zer-

legen. Es handelt sich hierbei um eine Polypeptidkette. Durch Dissoziation in schwach alkalischen Lösungen bei hohem Salzgehalt (1 M NaCl) konnte die Heterogenität einer Reihe von Gastropodenhäemocyaninen gezeigt werden (HEIRWECH et al., 1961, VAN HOLDE & VAN BRUGGEN, 1971). Bei diesen Bedingungen dissoziiert nur ein Teil des Häemocyanins. Ein mit α bezeichneter Anteil dissoziiert in 60 S Moleküle, während ein mit β bezeichneter Teil als 100 S Molekül stabil bleibt. Das *Helix pomatia* Häemocyanin teilt sich zu etwa 75 % in α -Häemocyanin und zu 25 % in β -Häemocyanin auf. Der β -Anteil läßt sich in zwei Fraktionen teilen, die sich in ihrer Löslichkeit in Acetatpuffer unterscheiden. Ein β_c genannter Anteil bleibt unlöslich, während der sog. β_s -Anteil sich löst. Von GIELENS et al. (1981) konnte gezeigt werden, daß der β_s -Anteil sich elektrophoretisch und immunologisch wie der α -Anteil verhält, weshalb β_s nun als α_n bezeichnet wird (LONTIE, 1983). Die Molekulargewichte der Gesamtmoleküle und der Dissoziationsprodukte sind wegen ihrer Größe schwer bestimmbar. Für die 100 S-Komponente sind Werte von 8-9 Mio. D, für die 60 S-Komponente von 3-4 Mio. D, für die 19 S-Komponente von etwa 700000 D und für die 11 S-Komponente von etwa 350000 D mit unterschiedlichen Methoden ermittelt worden.

Einen Durchbruch auf dem Gebiet der Struktur der Molluskenhäemocyanine, speziell der Gastropodenhäemocyanine, bildete die Arbeit von MELLEMA & KLUG, (1972). Mit Hilfe der Elektronenmikroskopie wurde ein Modell für das Häemocyanin von *Kelletia kelletia* vorgeschlagen. Durch Einbeziehung des Dissoziationsverhaltens von α - und β -Häemocyanin von *Helix pomatia* wurde das Modell weiter ausgebaut (SIEZEN & VAN BRUGGEN, 1974; GIELENS et al., 1977; VAN BREEMEN et al., 1979). Für Gastropodenhäemocyanine kann man folgende allgemeine strukturelle Eigenschaften angeben (VAN BRUGGEN, 1983) (Abb. 1): Das Gesamtmolekül ist ein hohles, zylinderförmiges Gebilde, mit einer rechteckigen Seitenansicht und einer kreisförmigen Draufsicht. Der Durchmesser des Zylinders ist 30-35 nm die Höhe 35-38 nm. Die Dissoziation in 60 S Komponenten erzeugt sog. 1/2 Moleküle, die aus Zylindern mit halber Höhe bestehen. Diese Zylinder besitzen eine Orientierung, d. h., man kann oben und unten unterscheiden. Weitere Dissoziation führt zu 1/10 Molekülen (19 S), deren fünf ein 1/2 Molekül bilden können. Die 1/10 Moleküle lassen sich in Hälften (1/20, 11 S) dissoziieren. Die 1/20 Moleküle mit einem Molekulargewicht von etwa 400000 D bestehen aus einer Polypeptidkette, die sich in acht Domänen oder funktionelle Einheiten einteilen läßt, die jeweils zwei

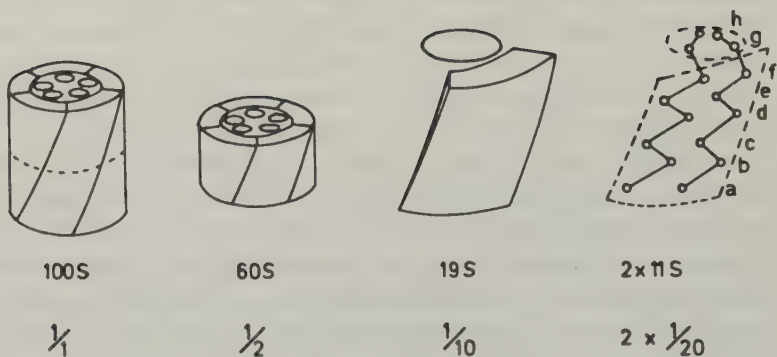


Abb. 1: Modell der Anordnung der Polypeptidketten im Hämocyanin der Weinbergsschnecke *Helix pomatia* und in den Dissoziationsprodukten (nach VAN BRUGGEN, 1983).

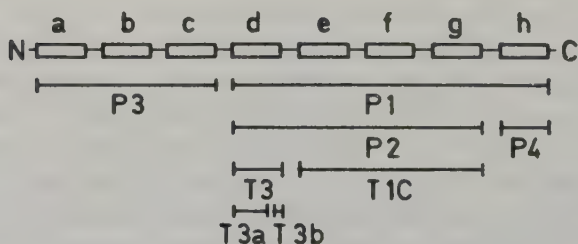


Abb. 2: Spaltschema des 1/20 Moleküls des Hämocyanins von *Helix pomatia*; die acht funktionellen Einheiten sind mit a-h bezeichnet; mit P und T sind Bruchstücke bezeichnet, die aus der Spaltung mit Plasmin oder Trypsin hervorgehen; T 3, T 3a und T 3b entsprechen d, d 1 und d 2 (nach GIELENS et al., 1980).

Kupferatome enthalten und ein Sauerstoffmolekül binden können. Eine funktionelle Einheit hat ein Molekulargewicht von etwa 50000 D, sechs bilden die Wand des Halbzylinders, zwei eine kragenartige Struktur.

Das Hämocyanin der Weinbergschnecke *Helix pomatia* ist eines der am besten untersuchten Molluskenhämocyanine (LONTIE, 1983). Durch limitierte Spaltung mit verschiedenen Proteasen ist es möglich, die funktionellen Einheiten im β -Hämocyanin von *Helix pomatia* zu isolieren und sie im Gesamtmolekül einzuordnen (GIELENS et al., 1980). Die einzelnen Untereinheiten werden mit a-h bezeichnet, wobei g und h den Kragen des Gesamtmoleküls bilden. Die acht funktionellen Einheiten besitzen sowohl gleiche wie verschiedene immunologische Determinanten (PREAUX et al., 1981 und 1983), sie unterscheiden sich in ihrem Molekulargewicht (50 - 75 kD) und ihrem Zuckergehalt (0 - 17,6 %) (WOOD et al., 1985).

Die geschilderten Gemeinsamkeiten funktioneller Natur einerseits und die Unterschiede struktureller Natur andererseits der Hämocyanine aus Arthropoden und Mollusken werfen die Frage einer Ähnlichkeit und möglichen Verwandtschaft auf. Sollte diese vorliegen, ist die Aufklärung der Primärstruktur von Hämocyaninen beider Typs eine der besten Möglichkeiten, Einblick in diese Frage zu geben. Für den Fall, daß keine Ähnlichkeiten zu finden sind, muß man von einer konvergenten Entwicklung ausgehen, die Moleküle mit vergleichbaren Eigenschaften entstehen ließ. Ein erster Zugang zu diesem Problem wurde über Vergleiche von Aminosäurezusammensetzungen versucht (GHIRETTI MAGALDI et al., 1975; GHIRETTI MAGALDI & TAMINO, 1977). Aus den Vergleichen wurde auf sehr große Sequenzhomologien (60 ± 10 %) der Hämocyanine aus den beiden Stämmen geschlossen. Diese Ergebnisse dienen als Hinweise für einen monophyletischen Ursprung der Hämocyanine. Immunologische Untersuchungen mit dem Ziel, gemeinsame antigene Determinanten zu finden, lieferten nur sehr schwache Kreuzreaktionen, so daß keine eindeutige Verwandtschaft der Hämocyanine der beiden Stämme abgeleitet werden konnte (LAMY et al., 1983). Spektroskopische Ähnlichkeiten der Hämocyanine mit den kupferhaltigen Tyrosinasen, mischfunktionellen Oxidasen, die Monophenole hydroxylieren und Diphenole zu Chinon oxidieren können und in vielen Organismen eine Rolle spielen, führten dazu, daß diese in einen möglichen Zusammenhang bei der Evolution der Hämocyanine gebracht wurden (HIMMELWRIGHT et al., 1980; VAN HOLDE & MILLER, 1982 S. 106-110).

Die Aufklärung der ungewöhnlichen Sequenz H-H-W-H-W-H während der Arbeit an der Untereinheit *e* von *Eurypelma californicum* war Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen an der Untereinheit *a* von *E. californicum* und an der Untereinheit III B von *Limulus polyphemus* (SCHNEIDER et al., 1982), da aus spektroskopischen Daten vier Histidinreste als kupferbindende Liganden möglich erschienen (CO et al., 1981). Diese Sequenz konnte als Teil des aktiven Zentrums angesehen werden, da sie bei mehreren Cheliceratenhämocyaninen gefunden wurde (SCHNEIDER et al., 1982; YOKOTA et al., 1983). Die Suche nach diesem histidinreichen Peptid wurde nun auf den anderen großen Stamm von Hämocyaninträgern, die Mollusken, ausgedehnt, um eine mögliche Allgemeingültigkeit der Struktur zu zeigen.

Voraussetzung für die Sequenzierung einer "Untereinheit" aus einem Molluskenhämocyanin waren die Arbeiten von GIELENS et al. (1975, 1977 und 1980), in denen erstmals funktionelle Einheiten - strukturell den Arthropodenuntereinheiten entsprechende Polypeptide - isoliert wurden. Durch Spaltung von 1/10 oder 1/20 Molekülen der β -Komponente des Hämocyanins der Weinbergschnecke *Helix pomatia* mit Plasmin entsteht ein Spaltgemisch aus Bruchstücken mit mehreren funktionellen Einheiten (Abb. 2). Die acht funktionellen Einheiten werden mit a-h bezeichnet. Die Bezeichnung der weiteren Spaltprodukte geht aus Abb. 2 hervor. Durch Gelfiltration lassen sich die Spaltstücke trennen. Nach einer anschließenden tryptischen Spaltung des Plasminfragments P 2 - es besteht aus d, e, f und g - und darauffolgende Gelfiltration läßt sich die funktionelle Einheit d in einer für die Sequenzierung ausreichenden Menge isolieren. d wird aber durch die Behandlung mit Trypsin nicht nur aus dem Molekül der β -Komponente herausgeschnitten, sondern auch mit hoher Ausbeute intern gespalten, d. h., es entstehen drei Peptide: Die ungespaltene Einheit d (T 3) mit einem Molekulargewicht im SDS-Gel von 56000 D und zwei Bruchstücke, d 1 (T 3a) und d 2 (T 3b), mit Molekulargewichten von 43000 D und 10000 D, die über eine Cystinbrücke verbunden sind, also erst nach Behandlung mit reduzierenden Agenzien getrennt werden können. d 1 ist N-terminal von d 2 angeordnet, wie sich aus dem Vergleich der Molekulargewichte verschiedener Spaltstücke erkennen läßt.

In einer vorausgehenden Arbeit (SIGMUND, 1983) wurde versucht, durch Spaltung des Peptidgemisches d, d 1 und d 2 mit Trypsin kleinere Peptide zu erhalten. Bei der Sequenzierung der tryptischen Peptide und des N-terminalen Bromcyanpeptides konnten aber weder das histidinreiche Peptid noch eine

hinreichende Homologie mit Arthropodenhämocyaninen gefunden werden. Daher wurde eine Sequenzierung der gesamten Einheit angestrebt, um durch Vergleich mit den bisher sequenzierten Arthropodenhämocyaninen vielleicht auch geringe Ähnlichkeiten in der Primärstruktur entdecken zu können. Die Lösung dieser Aufgabe war Inhalt der vorliegenden Arbeit.

MATERIAL UND METHODEN

1. Chemikalien

Alle Chemikalien wurden in p. A. Qualität von *MERCK*, Darmstadt bezogen, mit Ausnahme von:

Biogel P 10 *BIORAD*, Richmond, Kalifornien

Chymotrypsin, *BOEHRINGER*, Mannheim
Endoproteinase Lys-C aus
Lysobacter enzymogenes,
Eichproteine für die
Molekulargewichtsbestimmung

Acrylamid *FLUKA*, Buchs/Schweiz

Stickstoff, nachgereinigt *LINDE*, München

Trisacryl GF 05 *LKB*, Bromma/Schweden

Staphylococcus aureus V 8 *MILES*, Elkhart/USA
Protease

Trypsin (TPCK behandelt) *MILLIFORE*, Freehold/USA

Sephacryl S-200 super fine *PHARMACIA*, Uppsala/Schweden

4-Dimethylaminoazobenzol-4-
isothiocyanat (DABITC),
Pico-Puffer-System

Polyamid-Fertigfolien *SCHLEICHER & SCHUELL*, Dassel

Acrylamid
SERVA, Heidelberg
Bromcyan,
Coomassie Brilliant Blue,
Natriumdodecylsulfat (SDS),
N,N,N',N'-Tetramethyl-
ethylendiamin (TEMED),
Visking-Dialysierschläuche,

2. Isolierung der funktionellen Einheit d

Die funktionelle Einheit d wurde aus der β_c -Komponente des Hämocyanins der Weinbergschnecke *Helix pomatia* nach limitierter tryptischer Spaltung isoliert (GIELENS et al., 1975; 1980). Diese Aufarbeitung wurde von Herrn Dr. Constant GIELENS an der katholischen Universität Leuven durchgeführt.

Das Material, ein Gemisch der Peptide T3 (d), T3a (d 1) und T3b (d 2), wurde uns, gelöst in 0.1 M NH_4HCO_3 -Puffer, von Herrn Dr. Constant GIELENS mit der Post zugesandt. Nach Ankunft wurde die Proteinlösung in Fraktionen zu etwa 12 mg aufgeteilt, mit Essigsäure angesäuert, lyophilisiert und im Tiefkühlschrank aufbewahrt.

3. Proteinbestimmung

Zur Abschätzung des Proteingehalts in den aus der Trennung über die Gelfiltration erhaltenen Fraktionen wurde die Extinktion bei 280 nm bestimmt. Dabei wurde eine Extinktionseinheit einer Proteinkonzentration von etwa einem mg Protein pro ml Lösung zugeordnet.

4. Dialysen und Entsalzungen

Die Abtrennung niedermolekularer Bestandteile oder der Pufferwechsel in Lösungen von Peptiden mit Molekulargewichten über 10000 D erfolgte in vorgequollenen Visking-Dialysierschläuchen durch mindestens dreimaligen Pufferwechsel über 24 Stunden.

Lösungen von Peptiden mit Molekulargewichten unter 10000 D wurden über eine Trisacryl-Säule (2,5 x 30 cm) bei einem Durchfluß von 80 ml pro Stunde in

5 %-iger (v/v) Essigsäure entsalzt. Das Eluat wurde von einem Durchfluß-photometer bei 280 nm aufgezeichnet. Diese Methode wurde auch als Alternative zur Dialyse bei größeren Peptiden angewendet.

F. Denaturierung und Carboxymethylierung

Zur Denaturierung wurden etwa 12 mg lyophilisierte funktionelle Einheit d, ein Gemisch von d, d 1 und d 2 (d 1 und d 2 durch eine Cystinbrücke verbunden) in 300 bis 500 µl Carboxymethylierungspuffer (1 M Tris/HCl, 6 M Guanidiniumhydrochlorid, pH 8,2) gelöst und mit einem 100-fach molaren Überschuß an β -Mercaptoethanol über Cystein 20 Minuten bei 56 °C und anschließend eine Stunde bei Raumtemperatur unter Stickstoffatmosphäre inkubiert.

Zur SH-Gruppen-Alkylierung wurde das reduzierte Protein mit einem 100-fach molaren Überschuß an Jodessigsäure über Cystein, gelöst in 100 µl 1 N NaOH, versetzt und 30 Minuten bei Raumtemperatur, im Dunkeln und unter Stickstoff inkubiert. Durch Zugabe von 50 µl Mercaptoethanol wurde die Reaktion gestoppt (CRESTFIELD et al., 1963). Anschließend wurde sofort im Dunkeln auf eine Gelfiltrationssäule Sephacryl S-200 sf (1,5 x 160 cm), die mit einem Puffer aus 8 M Harnstoff, pH 3,5 (mit HCl eingestellt), äquilibriert war, aufgetragen, um die überschüssigen Reaktionsprodukte abzutrennen und die Peptide d, d 1 und d 2 zu isolieren.

6. Chemische Proteolysemethoden

a. Spaltung mit Bromcyan

Zur Spaltung mit Bromcyan wurde das denaturierte, carboxymethylierte und lyophilisierte Peptid in 1 bis 5 ml 70 %-iger (v/v) Ameisensäure gelöst und mit etwa 70-fach molarem Überschuß an Bromcyan über den Methioningehalt versetzt. Die Lösung wurde mit Stickstoff überschichtet und für 24 Stunden bei Raumtemperatur im Dunkeln aufbewahrt. Nach Zugabe der 5-fachen Menge an Wasser wurde die Reaktion durch Lyophilisierung gestoppt. (GROSS & WITKOP, 1961)

b. Spaltung mit Säure

Zur Spaltung mit Säure wurde das Peptid in 5 ml 70 %-iger (v/v) Ameisensäure gelöst und bei Raumtemperatur 24 Stunden inkubiert. Nach Zugabe von 20 ml Wasser wurde das Peptidgemisch lyophilisiert. Alternativ wurde das Peptid in 300 µl 0,02 M HCL gelöst, mit Stickstoff überschichtet, zwei Stunden bei 110 °C gespalten und nach Zugabe des gleichen Volumens an Wasser lyophilisiert (INGLIS et al., 1980).

7. Enzymatische Proteolysemethoden

a. Spaltung mit Trypsin

Das zu spaltende carboxymethylierte Peptid wurde in 0,1 M NH_4HCO_3 -Puffer, pH 8,0, gelöst, oder gegen diesen Puffer dialysiert. Zur Peptidlösung wurden 2 % (w/w) Trypsin zugegeben und der Ansatz 6 bis 17 Stunden bei 37 °C gehalten. Die Spaltung wurde durch Ansäuern mit Eisessig gestoppt. Anschließend wurde das Peptidgemisch lyophilisiert.

b. Spaltung mit Chymotrypsin

Die Bedingungen der Spaltung mit Chymotrypsin waren denen der Spaltung mit Trypsin gleich, mit Ausnahme der Spaltdauer, die zwischen einer und fünf Stunden betrug.

c. Spaltung mit *Staphylococcus aureus* V 8 Protease

Zur Spaltung mit der *Staphylococcus aureus* V 8 Protease (Spezifität nach Glutaminsäure) wurde das Peptid in 0,05 M NH_4HCO_3 -Puffer, pH 7,8, gelöst oder gegen diesen Puffer dialysiert. Nach Zugabe von 2 % (w/w) Protease wurde 24 Stunden bei 37 °C inkubiert. Durch Ansäuern mit Eisessig wurde die Reaktion gestoppt. Anschließend wurde die Lösung lyophilisiert (HOUNARD & DRAPEAU, 1972; DRAPEAU, 1977).

d. Spaltung mit Endoproteinase Lys-C aus *Lysobacter enzymogenes*

Nach Lösung in 0,1 M NH_4HCO_3 -Puffer, pH 8,65, wurde das zu spaltende Protein mit 2 % (w/w) Endoproteinase Lys-C aus *Lysobacter enzymogenes* versetzt und 24 Stunden bei 37 °C gehalten. Durch Zugabe von Eisessig und darauffolgende Lyophilisierung wurde die Reaktion gestoppt (BOEHRINGER, Mannheim, Produktinformation).

e. Analytische SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Elektrophoresen wurden im Plattengelfverfahren nach LAEMMLI (1970) in Apparaturen der Firma HÖLZEL, Dorfen/Obb. durchgeführt. Als Sammelgel diente ein 3 %-iges Gel mit pH 6,8, als Trenngel ein Gradientengel (10 bis 20 % Acrylamid) von pH 8,8. Proben wurden entweder im Puffer mit 8 M Harnstoff oder nach Zusatz von 2 % SDS und 20 % Saccharose aufgetragen. Als Marker für die Laufstrecke im Gel und zur Prüfung der Probe auf pH < 7 wurde ein Tropfen Bromphenolblau zugegeben. Als Eichproteine wurden verwendet:

Aprotinin	6500 D	Ovalbumin	45000 D
Cytochrom c	12500 D	Rindereserumalbumin	68000 D
Chymotrypsin	25000 D		

Die Elektrophoresen liefen bei konstanter Spannung zunächst für 30 Minuten mit 80 V und anschließend 4 Stunden mit 180 V bei Raumtemperatur. Gefärbt wurden die Gele für zwei Stunden in einer 0,15 %-igen Lösung von Coomassie Brilliant Blue G 250 in 25 %-iger Trichloressigsäure. Entfärbt wurde in einem Wasser-Methanol-Eisessig-Gemisch im Volumenverhältnis 175:10:15.

2. Gelfiltrationen

Zur Abtrennung von überschüssiger Jodessigsäure und zur Vortrennung des Peptidgemisches der Einheit d in die drei Fragmente (d, d 1 und d 2) wurde die Lösung sofort nach der Carboxymethylierung auf eine Sephacryl S-200 sf Säule (1,5 x 160 cm), die mit 8 M Harnstoff/HCl, pH 3,5, äquilibriert war, aufgetragen. Die Durchflußgeschwindigkeit war 4 ml in der Stunde. Das Eluat

wurde im Durchflußphotometer bei 206 und 280 nm gemessen und in Fraktionen zu 30 Minuten gesammelt.

Das gleiche System diente zur Trennung der gespaltenen Peptide aus dem Fragment d 1. Das lyophilisierte Peptidgemisch wurde in 2 bis 3 ml Harnstoffpuffer gelöst und unter obigen Bedingungen fraktioniert.

Eine Biogel P-10 Säule (1,5 x 120 cm), äquiliibriert mit 0,4 %-iger (v/v) Trifluoressigsäure (TFA), diente der Trennung von Peptiden aus der Bromcyanspaltung von Fragment d 2. Das lyophilisierte Peptidgemisch wurde in 1 ml Harnstoffpuffer (8 M, pH 3,5) aufgenommen und auf die Säule aufgetragen. Bei einer Durchflußrate von 4 ml in der Stunde wurden 30-Minuten-Fraktionen gesammelt und bei 206 und 280 nm gemessen.

10. Hochdruckflüssigkeitschromatographie

Die Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) ist eine sehr leistungsfähige Methode zur Trennung von komplexen Peptidgemischen. Es kamen verschiedene Puffersysteme und Säulen zur Anwendung. Zur Vorbereitung wurden die Peptide in 100 bis 500 µl 50 %-iger (v/v) Ameisensäure gelöst und in Portionen zu 100 µl aufgetragen. Alle Auftrennungen fanden bei Raumtemperatur statt. Das Eluat wurde automatisch bei einer Wellenlänge von 210 nm aufgezeichnet und von Hand nach Bedarf oder mit einem Sammler in Fraktionen zu 10 Minuten (nur bei Gelfiltration) gesammelt.

a. Gelfiltration zur Vortrennung des Säurespaltgemisches von CE 3

Säule:	LKB Ultropac, TSK G 2000 SW, (7,5 x 600 mm)
Vorsäule:	LKB Ultropac, TSK SWP (7,5 x 75 mm)
Lösungsmittel:	0,05 %-ige (v/v) Trifluoressigsäure
Durchfluß:	0,15 bis 0,3 ml pro Minute

b. Reversed-phase HPLC im TFA-System zur Peptidtrennung nach der Gelfiltration

Säule:	CHROMPACK Vydac TP/RP 10 µ, (4,6 x 250 mm)
Lösungsmittel A:	0,1 %-ige (v/v) Trifluoressigsäure
Lösungsmittel B:	80 % (v/v) Acetonitril in A

Gradienten:	linear, Ausgangs- und Endkonzentration an B und Dauer des Laufs verschieden (jeweils bei den Trennungen angegeben)
Durchfluß:	2 ml pro Minute

c. Reversed-phase HPLC im Acetat-System zur Nachreinigung von Peptiden
(KRATZIN et al., 1980)

Säule:	SERVA RP 18 5 μ , (4,6 x 250)mm)
Lösungsmittel A:	0,05 M Ammoniumacetat, pH 6,0
Lösungsmittel B:	60 % (v/v) Acetonitril in A, pH 6,0
Gradient:	linear, 0 - 80 % B in 50 Minuten
Durchfluß:	2 ml pro Minute

11. Aminosäureanalysen

Zur Aminosäureanalyse wurden einige Nanomol eines Peptids in 50 μ l 6 N HCL aufgenommen und bei 110 °C in zugeschmolzenen Glasröhrchen 24 Stunden hydrolysiert. Das Hydrolysat wurde getrocknet und im Analysenpuffer gelöst. Die Analysen wurden von Herrn Dr. Walter SCHARTAU mit einem Aminosäureanalyser Liquimat III der Firma KONTRON im Pico-Puffer-System durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe eines Peakintegrators der Firma SHIMADZU, Modell Chromatopac E I A, oder von Hand. Die Peakflächen wurden auf die Flächen von Eichläufen bezogen. Für Tryptophan wurden keine Werte bestimmt.

12. Bestimmung der Aminosäuresequenzen

a. Manuelle Sequenzierung

Die N-terminalen Aminosäuren wurden nach der Methode von CHANG et al. (1978) bestimmt. Die Inkubation wurde bei 56 °C und die Konvertierungsreaktion mit 50 %-iger (v/v) Trifluoressigsäure durchgeführt. Zur Identifizierung der DABTH-Aminosäuren wurden DC-Fertigfolien (F-1700 Micropolyamid) der Firma SCHLEICHER & SCHUELL der Größe 2,5 x 2,5 cm verwendet. Die zu untersuchenden Fraktionen wurden in 150 bis 2000 μ l 50 %-igem (v/v) Pyridin gelöst, 100 μ l für die Endgruppenbestimmung verwendet, 50 μ l für die Amino-

säureanalyse und der Rest für eine eventuelle Nachreinigung, Nachspaltung oder automatische Sequenzierung. Es wurden immer mindestens vier Aminosäuren bestimmt, um Aussagen über die Reinheit der Peptide und ihre Bedeutung für die Gesamtsequenz treffen zu können. Peptide, deren Sequenz in schon bekannten Bruchstücken enthalten war, wurden nach sicherer Identifizierung (zusätzlich durch Aminosäureanalyse) verworfen. Bei dieser Methode können die Aminosäuren Leucin und Isoleucin nicht unterschieden werden, so daß durch Aminosäureanalysen und automatische Sequenzierung Eindeutigkeit hergestellt werden mußte. Mit guten Ergebnissen ließen sich Peptidmengen von circa einem Nanomol sequenzieren. Die Zahl der identifizierbaren Aminosäuren war nicht nur mengenabhängig, sondern auch peptidspezifisch. Es konnten bis zu 23 Abbauschritte durchgeführt werden.

b. Automatische Sequenzierung

Viele Peptide wurden automatisch sequenziert (EDMAN & HENSCHEN, 1975), entweder mit einem Flüssigphasensequenator oder später mit einem Gasphasensequenator. Wurde die Aminosäure Prolin erwartet, so wurde die Abspaltzeit verlängert. Die Identifizierung der PTH-Derivate erfolgte durch isokratische HPLC (LOTTSPEICH, 1980). Die automatische Sequenzierung der Peptide wurde von Herrn Dr. Friedrich LOTTSPEICH am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried durchgeführt.

13. Automatische Sequenzierung nach Blockierung mit o-Phthaldialdehyd

Bei einigen Peptiden, die in der Sequenz Prolin enthielten, wurden vor der Modifizierung des Prolins mit Phenylisothiocyanat alle anderen freien N-Termini mit o-Phthaldialdehyd (OPA) blockiert (LOTTSPEICH et al., 1985). Anschließend wurde der Abbau, wie schon beschrieben, weiter durchgeführt.

14. Bestimmung des C-Terminus

Für die Bestimmung des C-Terminus wurden 200 nmol carboxymethyliertes Fragment d 2 in 12 ml 0,05 M Phosphatpuffer, pH 7,0, 10 mM EDTA und 0,1 % SDS gelöst. Nach Zugabe von 40 µg Carboxypeptidase Y und 40 µg Pepstatin A wurde die Lösung bei 30 °C inkubiert. Nach 0, 45, 110, 160, 200, 240, 300

und 360 Minuten wurden Proben von jeweils 200 μ l entnommen und die Reaktion durch Zugabe von 200 μ l 50 %-iger Trichloressigsäure gestoppt. Die Probe wurde zentrifugiert, der Überstand lyophilisiert, dreimal in Wasser aufgenommen und lyophilisiert und der Aminosäureanalyse zugeführt (HAYASHI et al., 1973; HAYASHI, 1977).

15. Berechnung des Hydrophilizitätsprofils

Zur Charakteristik eines Proteins zählt die Verteilung von Aminosäuren mit hydrophilen und hydrophoben Seitenketten. Mit Hilfe eines Computerprogramms nach LEVITT (1976), modifiziert von HOFF & WOODS (1981), wurde die Hydrophilizität der Sequenz der funktionellen Einheit d aufgezeichnet. Das entstandene Profil wurde durch Berechnung des gleitenden Mittelwerts von jeweils sechs Hydrophilizitätswerten geglättet. Die Berechnungen wurden am Computer des Max-Planck-Instituts in Martinsried von Herrn Josef KELLERMANN durchgeführt.

16. Vorhersage der Sekundärstruktur

Eine Vorhersage der Sekundärstruktur der funktionellen Einheit d aus der Primärstruktur wurde nach CHOU & FASMAN, (1978) durchgeführt. Die Berechnungen wurden am Computer des Max-Planck-Instituts in Martinsried von Herrn Josef KELLERMANN ausgeführt. Überlappende Regionen von α -Helix- und β -Faltblattstrukturen wurden nach einer von NISHIKAWA, (1983) eingeführten Methode aufgelöst.

ERGEBNISSE

I. Sequenzierungsstrategie

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit waren von der Struktur der funktionellen Einheit *d* viele der tryptischen Peptide, der N-Terminus von einigen Bromcyanpeptiden sowie fast die gesamte Sequenz eines kürzeren Bromcyanpeptids (CB 1) bekannt (SIGMUND, 1983) (Abb. 3). Die Spaltungen waren am Gesamtgemisch der funktionellen Einheit *d* durchgeführt worden, das nach Reduktion aus drei Peptiden besteht, die bei GIELENS et al. (1980) mit T3, T3a und T3b und bei WOOD et al. (1985) und in der vorliegenden Arbeit mit *d*, *d* 1 und *d* 2 bezeichnet sind.

Vom N-Terminus des Gesamtmoleküls *d* war nur die erste Aminosäure bekannt (Asparagin oder Asparaginsäure). Vor einer weiteren Sequenzierung wurden daher die drei Bruchstücke der funktionellen Einheit *d* getrennt, um die N-Termini zu bestimmen und bei den Spaltungen auf definierte Peptide zurückgreifen zu können.

Für die spezifischen Spaltungen und die Gewinnung überlappender Peptide standen die Enzyme zur Spaltung nach Lysin und Arginin (Trypsin) und Glutaminsäure (*Staphylococcus aureus* Protease) im Vordergrund. Um danach noch fehlende überlappende Peptide isolieren zu können, wurden Spaltungen zwischen Asparaginsäure und Prolin (70 %-ige Ameisensäure), nach Asparaginsäure (verdünnte Salzsäure bei 110 °C), nach aromatischen Aminosäuren (Chymotrypsin) und nach Lysin (Endoproteinase Lys-C) durchgeführt.

II. Trennung des Peptidgemisches der funktionellen Einheit *d*

Zur Trennung des Peptidgemisches der funktionellen Einheit *d* in die drei zu erwartenden Peptide *d*, *d* 1 und *d* 2 wurde das carboxymethylierte Gemisch über eine S-200 Säule getrennt. Das Elutionsprofil in Abb. 4 zeigt drei Gipfel, mit I, II und III bezeichnet, deren Molekulargewichte in der SDS-Gelelektrophorese (Abb. 5) und deren Anfangssequenzen bestimmt wurden. I hat ein Molekulargewicht von etwa 56000 Dalton und die Anfangssequenz D-A-V-T-, II ein Molekulargewicht von circa 43000 D und ebenfalls D-A-V-T- als N-Terminus und III ein Molekulargewicht von circa 10000 D und eine Anfangssequenz G-K-N-D-. Durch den Vergleich der Molekulargewichte der Fragmente I,

II und III mit denen aus der Arbeit von GIELENS et al. (1980) ließen sich diese T3, T3a und T3b (d, d 1 und d 2) zuordnen. Damit war bestätigt, daß das Peptid d 2 mit dem Molekulargewicht von 10000 D und der N-terminalen Sequenz G-K-N-D C-terminal von d 1 steht und d das Gesamt-molekül ohne interne Spaltstelle, die durch eine Cystinbrücke zusammengehalten wird, darstellt. Diese Trennung stellte eine günstige Möglichkeit dar, die Anzahl der Peptide aus einer Spaltung zu verringern, da die Peptide d 1 und d 2 getrennt bearbeitet werden konnten. Die Überlappung von d 1 und d 2 könnte dann durch Spaltung des Peptids d, das in geringer Ausbeute (unter 10 % von d 1 und d 2) auftritt, erhalten werden.

1	10	20	30	40	50
DAVTVASHVRKX	LDLT	AGEIES	IRSAFLDI	QQDHTYENIAS	FXGKPGLC
51	60	70	80	90	100
QHE	GHKVACSV		LYVEQ		
101	110	120	130	140	150
LPDL	ATYYN	FDPNPFF	VAGEDAVTTR		
151	160	170	180	190	200
201	210	220	230	240	250
			GLPXNEADCA	ENLXR	XP
251	260	270	280	290	300
PR	PADXF	NHFHYEYDT		QXFQD	LN

Abb. 3: Stand der Kenntnis zu Beginn dieser Arbeit. Teilsequenzen, die sich in das Fragment d 1 einordnen ließen, nach der Arbeit von Frau SIGMUND. Die Peptide sind allerdings zur besseren Übersicht in der richtigen Reihenfolge angeordnet, ¹L besagt, daß die beiden Aminosäuren Isoleucin und Leucin nicht unterschieden werden konnten (regelmäßig bei Bestimmung mit DABITC).

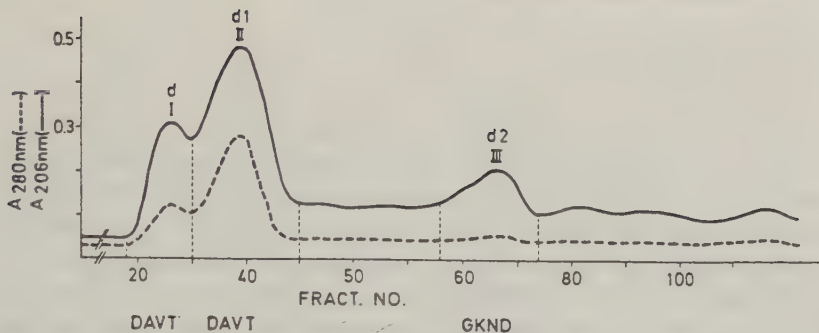


Abb. 4: Gelfiltration nach Denaturierung, Reduktion und Carboxymethylierung des Gemische d, d 1 und d 2 der funktionellen Einheit d auf einer Sephacryl S-200 sf Säule (1,5 x 160 cm), äquilibriert mit 8 M Harnstoff, pH 3,5 (mit HCl eingestellt), Durchflußrate 4 ml pro Stunde, Fraktionsgröße 30 Minuten. Die Anfangssequenzen der Peptide sind unterhalb der Fraktionen vermerkt.

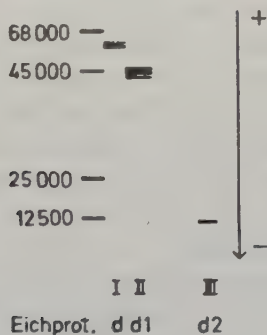


Abb. 5: Schematische Darstellung der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach LAEMMLI (1970) der Fraktionen aus Abb. 4., 10 bis 20 % Acrylamid im Gel.

III. Strukturaufklärung des Fragments d 1

1. Spaltung des Fragments d 1 mit Bromcyan

Um zunächst eine geringe Anzahl von Peptiden zu erhalten, wurde das Fragment d 1 mit Bromcyan gespalten. Aus der Arbeit von Frau SIGMUND (1983) war der Methioningehalt (drei Methioninreste) und das Spaltmuster der gesamten funktionellen Einheit d bekannt. Anstelle der demnach zu erwartenden geringen Anzahl von Gipfeln wurden jedoch nach der Gelfiltration über die S-200 Säule weit mehr Gipfel getrennt. Schon aus den von Frau SIGMUND bearbeiteten Bereichen der kleinen Bromcyanpeptide CB VII und CB VIII aus der Spaltung der ungetrennten Einheit d ließen sich vier verschiedene Peptide isolieren. Da zwei dieser Peptide mit Prolin begannen, wurde daraus geschlossen, daß durch die Wirkung der 70 %-igen Ameisensäure mehrere säurelabile Asp-Pro Stellen gespalten worden waren (FISZKIEWICZ et al., 1970).

Für die Bromcyanspaltung wurden 15 mg des Fragments d 1 eingesetzt. Das Gemisch wurde zur Trennung durch Gelfiltration auf eine Sephacryl S-200 sf Säule aufgetragen. Es konnten acht Fraktionen getrennt werden (Abb. 6). Von jeder Fraktion wurden 50 µl für eine Molekulargewichtsbestimmung der Peptide mit der PAGE entnommen. Die Ergebnisse für die größeren Peptide zeigt Abb. 7. Die einzelnen Fraktionen wurden entsalzt und lyophilisiert.

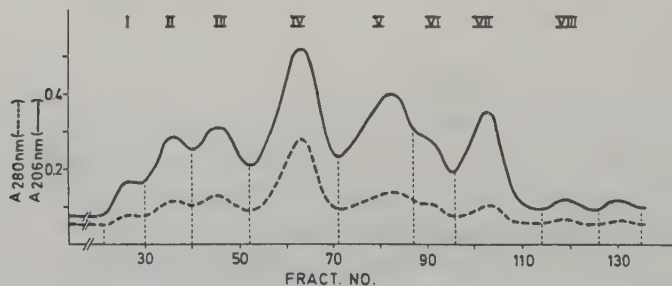


Abb. 6: Gelfiltration der Bromcyanpeptide des Fragments d 1 auf einer Sephacryl S-200 sf Säule (1,5 x 160 cm), äquilibriert mit 8 M Harnstoff, pH 3,5 (mit HCl eingestellt), Durchflußrate 4 ml pro Stunde, Fraktionsgröße 30 Minuten. Auftrennung in acht Gipfel.

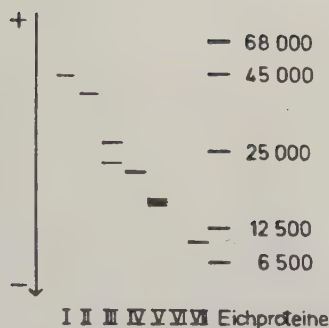


Abb. 7: Schematische Darstellung der SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese nach LAEMMLI (1970) der Fraktionen I - VII aus der Bromcyanspaltung des Fragments d 1 nach der Gelfiltration, 10-20 % Acrylamid im Gel.

Die Fraktionen CB V, CB VI und CB VIII aus der Gelfiltration wurden mittels HPLC im TFA-System getrennt. Dazu wurden sie in 200 bis 500 μ l 50 %-iger Ameisensäure gelöst und in Portionen zu 100 μ l auf die Säule aufgetragen. CB VII wurde von Frau SIGMUND weiterbearbeitet, da diese Fraktion das N-terminale Bromcyanpeptid CB 1 enthielt. Durch Nachspaltung mit *Staphylococcus aureus* Protease V 8 und Trypsin konnte dessen Sequenz aus 63 Aminosäuren fast vollständig aufgeklärt werden (SIGMUND, 1983). Die Trennungen der anderen drei Fraktionen zeigen die Abb. 8 bis 10. CB V ließ sich in zwei Gipfel trennen, CB VI in drei und CB VIII in zwei.

Zur manuellen Bestimmung der N-terminalen Sequenzen wurden die lyophilisierten Gipfel in 1000 μ l 50 % Pyridin gelöst, 100 μ l für die Sequenzbestimmung und 50 μ l für eine Aminosäureanalyse verwendet. Es konnten insgesamt sechs verschiedene N-Termini von Bromcyanpeptiden, in Klammern die endgültigen Bezeichnungen der Peptide in der Sequenz, identifiziert werden:

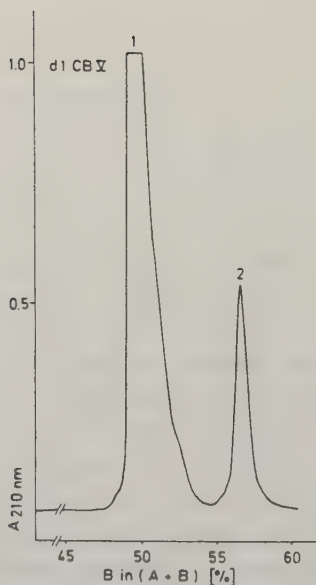


Abb. 8: Reversed-phase HPLC der Fraktion CB V aus der Spaltung von Fragment d 1 mit Bromcyan. Die Trennung erfolgte auf einer VYDAC TP/RP 10 Säule (4 x 250 mm), der Firma CHROMPACK. A: 0,1 % TFA, B: 80 % Acetonitril in A, Gradient von 30-70 % B in (A + B) in 50 min, Durchflußrate 2 ml pro Minute.

Abb. 9: Reversed-phase HPLC der Fraktion CB VI aus der Spaltung von Fragment d 1 mit Bromcyan. Die Trennung erfolgte auf einer VYDAC TP/RP 10 Säule (4 x 250 mm), der Firma CHROMPACK. A: 0,1 % TFA, B: 80 % Acetonitril in A, Gradient von 40-80 % B in (A + B) in 40 min, Durchflußrate 2 ml pro Minute.

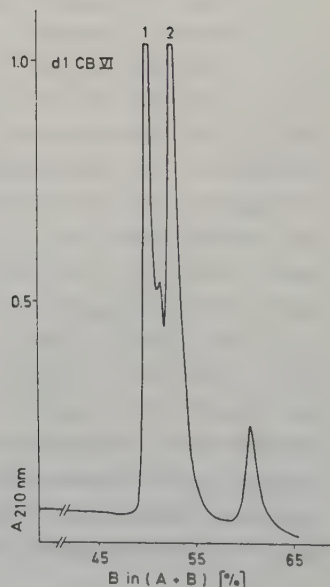
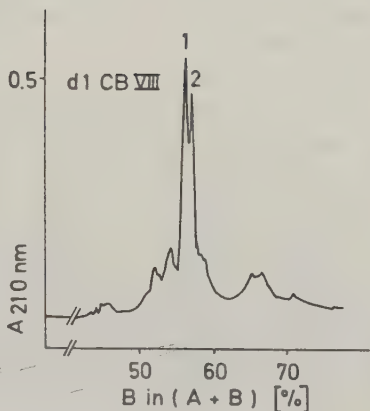


Abb. 10: Reversed-phase HPLC

der Fraktion CB VIII
aus der Spaltung von
Fragment d 1 mit
Bromcyan. Die Tren-
nung erfolgte auf ei-
ner VYDAC TP/RP 10
Säule (4 x 250 mm),
der Firma CHROMPACK.

A: 0,1 % TFA, B: 80 %
Acetonitril in A,
Gradient von 0-90 % B
in (A + B) in 50 min,
Durchflußrate 2 ml pro
Minute.



CB V 1 (CB 3):

R-K-P-I/L-Q-P-F-Q-D-K-K-I/L-N-P-R-

CB V 2 (AC 2, AC 3):

P-N/Q-P-F/E-

CB VI 1 (CB 3):

R-K-P-I/L-

CB VI 2 (CB 1, CB 2, CB 3):

D/P/R-A/T/K-V/F/P-T/P/I/L-

CB VIII 1/2 (AC 4):

P-V-F-F-I/L-H-H-A-N-

In der Fraktion CB VI 2 konnte durch Subtraktion der beiden Sequenzen von CB VI 1 (CB 3) und CB VII (CB 1), dem N-terminalen Bromcyanpeptid, das mit den Aminosäuren D-A-V-T- beginnt, eine dritte Sequenz, die P-T-F-P- lautet, ermittelt werden. CB V 1 und CB VIII 1/2 wurden automatisch sequenziert. CB VIII 1 und CB VIII 2 hatten dieselbe Sequenz und wurden zur automatischen Sequenzierung vereinigt. Sie unterschieden sich wahrscheinlich in der C-terminalen Aminosäure, die im einen Fall Homoserin und im anderen Homoserinlacton ist. Von CB V 1 wurden 30 Schritte bestimmt, von CB VIII 1/2 konnten neun Aminosäuren identifiziert werden:

CB V 1 (CB 3):

R-K-P-L-Q-P-F-Q-D-K-K-L-N-P-R-X-I-T-N-I-Y-S-R-P-A-D-
T-F-D/C-Y-

CB VIII 1/2 (AC 4):

P-V-F-F-L-H-H-A-N-

Bei der Sequenz von CB 3 konnte die Aminosäure an der 16. Stelle nicht identifiziert werden, an Position 29 ließen sich die Aminosäuren Asparaginsäure und Cystein nicht unterscheiden. Bei AC 4 wurde die fünfte Aminosäure als Leucin bestimmt.

	CB 1	CB 2	CB 3	AC 4
C	0,7 (2)	0,2 (1)	0,2 (1)	0,2 (1)
D	6,5 (5)	26,0 (13)	13,3 (5)	5,2 (2)
N	(1)	(10)	(8)	(3)
T	3,2 (4)	5,5 (6)	4,4 (5)	0,9 (1)
S	7,2 (6)	13,2 (11)	3,4 (3)	0,5 (0)
E	7,3 (4)	22,3 (12)	9,8 (4)	3,9 (2)
Q	(3)	(9)	(5)	(2)
P	0,7 (1)	9,5 (11)	7,5 (7)	1,5 (2)
G	5,2 (3)	12,2 (6)	6,7 (4)	4,7 (1)
A	5,8 (6)	13,4 (14)	3,6 (3)	3,7 (4)
V	5,4 (5)	8,7 (8)	7,1 (6)	1,5 (1)
M	0,2 (1)	0,3 (1)		0,3 (1)
I	2,8 (3)	5,9 (6)	3,4 (3)	1,8 (2)
L	5,1 (5)	17,5 (17)	9,5 (9)	5,2 (5)
Y	0,7 (1)	7,5 (11)	4,5 (6)	1,5 (2)
F	1,5 (2)	12,3 (14)	4,3 (5)	1,7 (2)
K	3,3 (3)	5,3 (4)	5,6 (5)	
H	1,1 (1)	7,5 (7)	4,3 (4)	1,8 (2)
R	1,0 (1)	7,8 (7)	7,4 (7)	2,1 (3)
W		(5)		(2)
I	(64)	(173)	(90)	(38)

Tab. 1: Aminosäurezusammensetzung einiger Peptide aus der Spaltung von Fragment d-1 mit Bromcyan, in Klammern die Zahl der Aminosäuren aus der Sequenzierung. Methionin wurde als Homoserin / Homoserinlacton bestimmt.

Von der Fraktion CB IV (CB 2) wurde ohne Trennung über die HPLC ein Aliquot 5 Schritte weit ansequenziert:

CB 2: P-T-F-P-S-

Diese Sequenz ist identisch mit der durch Subtraktion ermittelten von CB VI 2. Zur Bestimmung von weiteren Aminosäuren wurde eine Nachspaltung mit der Protease aus *Staphylococcus aureus* V 8 durchgeführt. Diese Spaltung wurde deshalb gewählt, weil durch die Arbeit von Frau SIGNUND schon viele Peptide aus der tryptischen Spaltung bekannt waren, die dann zu Überlappungen dienen konnten. 4 mg CB IV wurden gespalten und auf der HPLC im TFA-System aufgetrennt. Es konnte eine Vielzahl von Gipfeln isoliert werden (Abb. 11), die lyophilisiert und von Hand ansequenziert wurden.

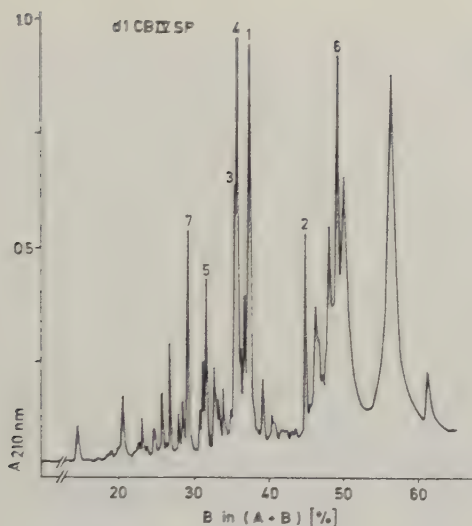


Abb. 11: Reversed-phase HPLC nach der Spaltung von CB 2 mit der Protease aus *Staphylococcus aureus* V 8 auf einer VYDAC TP/RP 10 Säule (4 x 250 mm) der Firma CHROMPACK. A: 0,1 % TFA, B: 80 % Acetonitril in A, Gradient von 30-70 % B in (A + B) in 50 min, Durchflußrate 2 ml pro Minute.

CB 2 SP 5 wurde noch zusätzlich durch den Sequenator bestätigt und um eine Aminosäure, die C-terminale Glutaminsäure, verlängert. Die Aminosäureanalysen der Fraktionen (Tab. 2) ließen die Länge der einzelnen Peptide abschätzen und einige Isoleucin/Leucin-Positionen klären. Nachfolgend die Sequenzen der isolierten Peptide:

CB 2 SP 1:	P-I-F-P-S-W-H-R-L-Y-V-
CB 2 SP 2:	A-I/L-I/L-D-H-G-S-S-V-A-V-P-
CB 2 SP 3:	Q-R-F-D-P-N-P-F-F-
CB 2 SP 4:	L-F-N-N-N-Y-F-Y-
CB 2 SP 5:	Q-D-N-F-D-D-F-E;
CB 2 SP 6:	V-I/L-H-N-A-I/L-
CB 2 SP 7:	L-Q-R-Y-R-G-L-P-Y-N-(E);

Wie die Aminosäureanalysen in Tab. 1 zeigen, sind nur zwei Peptide (CB 2 SP 5 und CB 2 SP 7) bis zum C-terminalen Glutaminsäurerest und ein Peptid (CB 2 SP 4) bis fast zum C-Terminus sequenziert worden. Die restlichen Peptide sind sehr viel länger und ließen sich nur bei größerer Materialmenge weiter sequenzieren.

	SP 1	SP 2	SP 3	SP 4	SP 5	SP 6	SP 7
C							
D	0,5 (0)	4,2 (3)	3,9 (3)	3,2 (0)	4,1 (3)	4,7 (3)	1,5 (0)
N		(1)	(1)	(3)	(1)	(2)	(1)
T	0,9 (1)	1,1 (1)	1,9 (2)			2,1 (2)	
S	1,2 (1)	4,3 (5)	1,6 (1)			3,7 (4)	
E	3,9 (3)	2,2 (1)	3,7 (2)	1,4 (1)	2,5 (1)	2,2 (1)	2,2 (1)
Q	(1)	(1)	(2)		(1)	(1)	(1)
P	1,7 (2)	2,7 (3)	x (4)			0,9 (1)	1,1 (1)
G	1,3 (0)	2,9 (1)	5,7 (2)		1,2 (0)	3,7 (2)	1,8 (1)
A	0,5 (0)	3,2 (3)	2,2 (2)			4,2 (5)	
V	2,2 (2)	2,4 (2)	2,1 (2)			2,1 (2)	
M							
I		3,1 (3)				1,1 (1)	
L	1,4 (1)	4,2 (4)		0,8 (1)		5,5 (6)	2,0 (2)
Y	0,3 (1)	1,3 (3)		1,3 (2)		1,6 (2)	1,3 (2)
F	0,7 (1)	0,7 (1)	2,5 (3)	1,8 (2)	1,7 (2)	3,1 (4)	
K		2,3 (2)	1,0 (1)			1,2 (1)	
H	1,1 (1)	1,1 (1)				4,8 (5)	
R	1,0 (1)	1,0 (1)	2,1 (2)			1,0 (1)	2,0 (2)
W	(1)	(1)				(3)	
Z	(16)	(37)	(27)	(9)	(8)	(46)	(11)

Tab. 2: Aminosäurezusammensetzung der Peptide aus der Nachspaltung von CB IV mit der Protease aus *S. aureus*, in Klammern die Zahl der Aminosäuren aus der Sequenzierung. (x: Prolin konnte nicht bestimmt werden).

Aus der Abb. 12 geht die Bedeutung der aus den Bromcyanpeptiden bisher ermittelten Aminosäuren für die Gesamtsequenz von Fragment d 1 hervor. Man vergleiche sie mit Abb. 3. Die einzelnen Peptide sind in der richtigen Reihenfolge der Sequenz dargestellt, selbst wenn sie zu dem Zeitpunkt der Arbeit noch nicht feststand. CB 1 war durch die Arbeit von Frau SIGMUND fast vollständig sequenziert. Dieses Peptid stand nun als N-terminales Bromcyanpeptid fest. Von CB 2 waren durch CB 2 SP 1 11 N-terminale Aminosäuren bekannt, die durch eine Überlappung mit einem tryptischen Peptid (T 5, von Frau SIGMUND isoliert und sequenziert), um zwei Positionen verlängert werden konnten. CB 2 SP 3 verlängerte T 9 C-terminal um zwei Positionen. Dieses Peptid beinhaltet auch die Sequenz P-N-P-F- (AC 2), die schon in CB V 2 vorkam, allerdings verunreinigt mit einem weiteren Peptid, das nun durch Subtraktion als P-Q-P-E- (AC 3) bestimmt werden konnte. Hier bestätigte sich die Vermutung, daß eine Saurespaltung vorlag, da vor dem Prolinrest

von AC 2 die Aminosäure Asparaginsäure steht. CB 2 SP 7 konnte durch T 15 verlängert werden. Viele neue Positionen ergab die Sequenzierung von 30 Schritten von CB 3, es konnten T 16, T 17 und T 19 eingeordnet werden. Insgesamt wurden durch die Bromcyanspaltung 67 neue Positionen und einige überlappende Peptide sequenziert. In der nächsten Spaltung sollte nun nach weiteren überlappenden Peptiden gesucht werden. Obwohl schon Sequenzen vieler tryptischer Peptide bekannt waren (SIGMUND, 1983), wurde eine Spaltung von Fragment d 1 mit Trypsin als günstig angesehen, da nur wenige dieser Peptide bis zum C-Terminus bestimmt worden waren und an einigen Positionen die Aminosäuren unklar waren. Durch Nachspaltungen besteht dann die Möglichkeit, weitere Sequenzinformationen zu erlangen. In Abb. 12 sind die durch die Bromcyanspaltung und Nachspaltung mit der Protease aus *S. aureus* neu erhaltenen Sequenzinformationen unterstrichen. Mögliche Spaltstellen für Trypsin sind mit † bezeichnet.

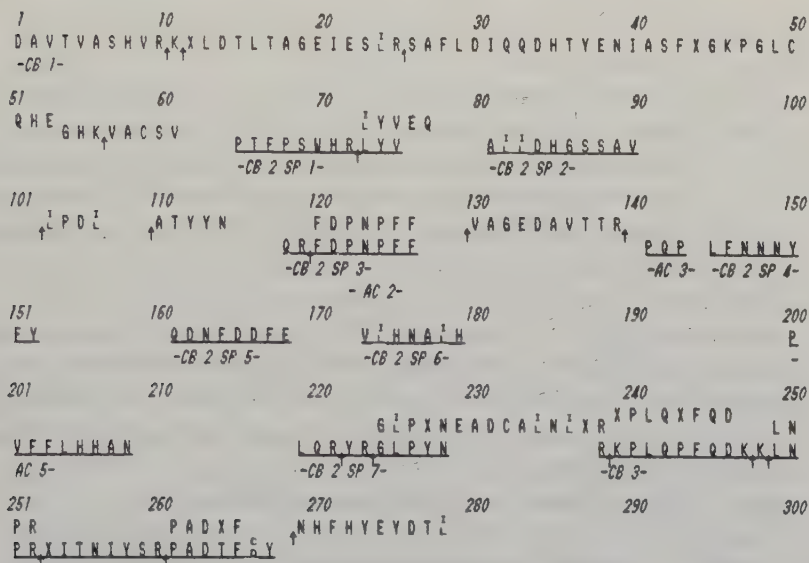


Abb. 12: Teilsequenzen des Fragments d 1 nach der Bromcyanspaltung und Nachspaltung von CB 2 mit der *S. aureus* V 8 Protease. Die Peptide aus der Bromcyanspaltung sind unterstrichen. Mögliche Spaltstellen für Trypsin sind mit † markiert.

2. Spaltung des Fragments d 1 mit Trypsin

Für die Spaltung mit Trypsin wurden 18 mg von Fragment d 1 eingesetzt. Das Spaltgemisch wurde zur Vortrennung auf eine Sephacryl S-200 sf Säule aufgetragen (Abb. 13). Zur weiteren Auftrennung wurden sechs verschiedene Fraktionsbereiche gewählt, die entsalzt und anschließend lyophilisiert wurden.

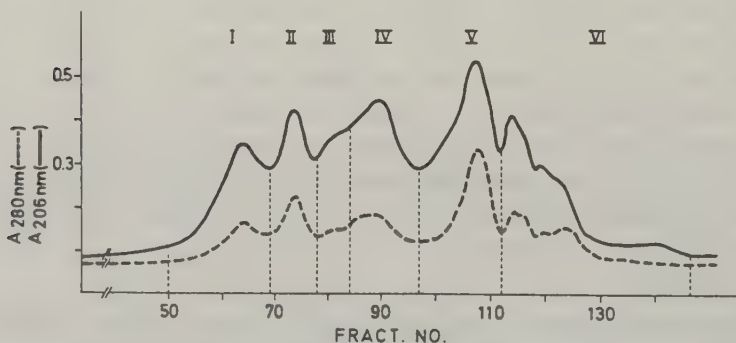


Abb. 13: Gelfiltration der Peptide von Fragment d 1 nach Spaltung mit Trypsin auf einer Sephacryl S-200 sf Säule (1,5 x 160 cm), äquilibriert mit 8 M Harnstoff, pH 3,5 (mit HCl eingestellt). Durchflußrate 4 ml pro Stunde. Fraktionsgröße 30 Minuten. Die weiterverarbeiteten Fraktionsbereiche sind durch senkrechte Linien abgegrenzt.

Die Fraktionen I - VI wurden jeweils in 300 µl 50 %-iger Ameisensäure gelöst und im TFA-System in Portionen zu 100 µl getrennt. Die Abb. 14 bis 16 zeigen die Elutionsprofile der Fraktionen T I, T II, T IV, T V und T VI. Die isolierten Gipfel wurden lyophilisiert und ansequenziert. Dies führte zu den folgenden Ergebnissen.

Aus T I (Abb. 14) konnten zwei Peptide gewonnen werden:

T 18/19: X-I-T-N-I-Y-S-R-P-A-D-T-F-D-Y-R;

T 11: D-P-Q-P-E-L-F-N-N-N-Y-F-Y-E-Q-A-

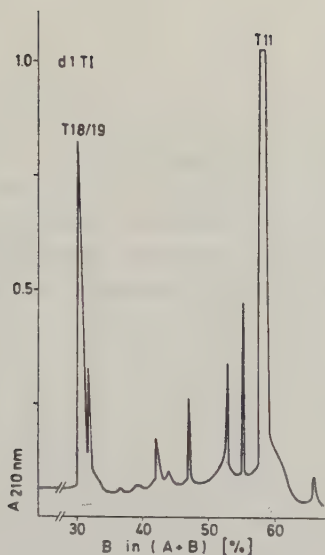


Abb. 14: Reversed-phase HPLC von Fraktion T 1 aus der Spaltung von Fragment d 1 mit Trypsin auf einer VYDAC TP/RP 10 Säule (4 x 250 mm) der Firma CHROMPACK, A: 0,1 % TFA, B: 80 % Acetonitril in A, Gradient von 0-70 % B in (A + B) in 50 min, Durchflußrate 2 ml pro Minute.

Beide Peptide waren bisher noch nicht isoliert worden. Der C-terminale Bereich (P-A-D-) von T 18/19 war schon als tryptisches Peptid bekannt, die Arginin/Prolin Bindung in T 1 wird offensichtlich partiell gespalten. Dadurch, daß T 18/19 in das Peptid CB 3 eingeordnet werden konnte, ließ sich der Position 266 eindeutig eine Asparaginsäure zuschreiben und CB 3 um die Aminosäure Arginin verlängern. Die erste Aminosäure von T 18/19 konnte, wie schon dieselbe Position in CB 3, nicht bestimmt werden. Aus mehreren Gründen wurde geschlossen, daß diese eine Zuckerbindungsstelle in der Einheit d darstellt. Bei der nicht bestimmaren Aminosäure handelt es sich, wie man aus der Aminosäureanalyse (Tab. 4) ersehen kann, um ein(e) Asparagin(säure); die ersten drei Aminosäuren heißen demnach N-I-T. Dies ist eine für Zuckerbindungsstellen charakteristische Sequenz (JACKSON & HIRS, 1970). Betrachtet man die Aminosäureanalysen der beiden Peptide (Tab. 3/4), so stellt man fest, daß T 11 wesentlich länger ist. Da T 18/19 und T 11 in der Gelfiltration in der gleichen Fraktion erscheinen, müssen sie ein ähnliches Molekulargewicht besitzen. Diese Differenz kann durch eine Zuckerseitenkette erklärt werden. Eine weitere Auffälligkeit ist das Verhalten der zwei Peptide in der reversed-phase HPLC. T 18/19 wird bei relativ geringer Acetonitrilkonzentration (Abb. 14) eluiert, hat also einen stark hydrophilen Charakter, eine Eigenschaft, die durch eine Zuckerseitenkette bedingt sein kann. Nach WOOD et al. (1985) besitzt die Einheit d bei einem Molekulargewicht von

55000 D einen Kohlenhydratanteil von 3281 D (Summe von 20 Zuckermolekülen). Die Kohlenhydratreste können an einer oder an verschiedenen Stellen in der Polypeptidkette befestigt sein. Da keine weiteren Peptide mit auffälligem Verhalten in der Trennung oder Sequenzierung gefunden wurden und auch keine Sequenzabschnitte N-X-T/S auftreten, kann geschlossen werden, daß die Position 1 im Peptid T 18/19 einen Asparaginrest darstellt und außerdem den gesamten Zuckeranteil bindet. T 11 wurde automatisch sequenziert. Es konnten 16 Schritte identifiziert werden. T 11 verband die Peptide AC 3 und CB 2 SP 4.

In der Trennung von Bereich T II durch die HPLC (Abb. 15) wurden zwei neue Peptide isoliert, T 18 und T 5:

T 18: X-I-T-N-I-Y-S-R;

T 5: L-Y-V-L-Q-V-E-E-A-L-L-D-H-G-S-S-V-A-V-P-Y-F-D-W-I-S-P-I-Q-

T 18 konnte bis zum C-terminalen Arginin sequenziert werden, die Sequenz ist mit dem ersten Teil von T 18/19 identisch, hier wurde also die Arginin/Prolin Bindung gespalten. Was den Zuckeranteil betrifft, so gelten die vorstehenden Betrachtungen von T 18/19. T 5 konnte maschinell 29 Schritte weit sequenziert werden. Mit diesem Peptid, dessen N-terminale fünf Aminosäuren schon von Frau SIGMUND sequenziert worden waren, konnten CB 2 SP 1 und CB 2 SP 2 verbunden und die Sequenz über CB 2 SP 2 hinaus verlängert werden. Die Aminosäureanalyse von T 5 (Tab. 3) zeigt, daß dieses Peptid nur um wenige Aminosäuren länger sein kann.

T III wurde, da hier nur Peptide getrennt wurden, die in den Fraktionen T II und hauptsächlich in T IV in weit größerer Ausbeute enthalten waren, für eine weitere Bearbeitung nicht herangezogen.

Das Elutionsprofil der Fraktion T IV nach der HPLC (Abb. 16) zeigt ein komplexes Gemisch an Peptiden. In ausreichender Menge konnten folgende Peptide isoliert und sequenziert werden:

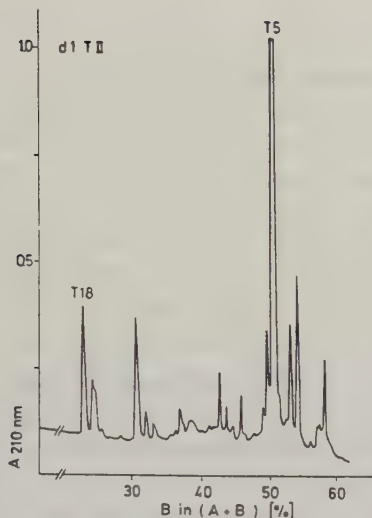
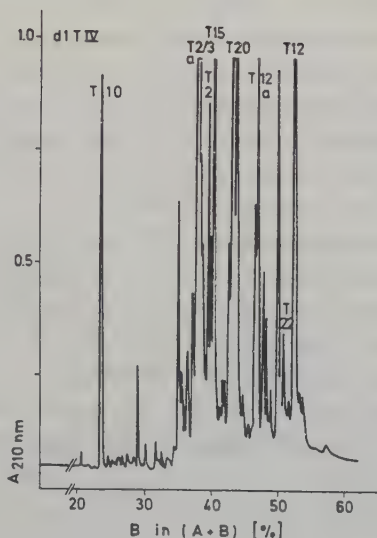


Abb. 15: Reversed-phase HPLC von Fraktion T II aus der Spaltung von Fragment d 1 mit Trypsin auf einer VYDAC TP/RP 10 Säule (4 x 250 mm) der Firma CHROMPACK, A: 0,1 % TFA, B: 80 % Acetonitril in A, Gradient von 0-70 % B in (A + B) in 50 min, Durchflußrate 2 ml pro Minute.

Abb. 16: Reversed-phase HPLC von Fraktion T IV aus der Spaltung von Fragment d 1 mit Trypsin auf einer VYDAC TP/RP 10 Säule (4 x 250 mm) der Firma CHROMPACK, A: 0,1 % TFA, B: 80 % Acetonitril in A, Gradient von 0-70 % B in (A + B) in 50 min, Durchflußrate 2 ml pro Minute.



T 10: V-A-G-E-D-A-V-T-T-R;
 T 2a/3: (K-D-I/L-D-T-I/L-T-A-G-E-I/L-E-S-I/L-R);
 S-A-F-I/L-D-I/L-Q-Q-D-H-T-Y-E-N-I/L-A-
 T 2: D-I/L-D-T-I/L-T-A-G-E-I/L-E-S-I/L-R;
 T 15: G-I/L-P-Y-N-E-A-D-C-A-I/L-N-I/L-M-R;
 T 20: N-H-F-H-Y-E-Y-D-T-L-E-L-N-H-Q-T-V-P-
 T 12a: D-Y-T-A-F-D-P-V-F-F-L-H-H-A-N-T-D-R
 T 22: V-F-A-G-F-L-I-H-N-N-G-L-S-A-D-
 T 12: Y-S-F-S-S-L-D-Y-T-A-F-D-P-V-F-F-

Die Peptide T 10, T 2, T 3, T 15 und T 20 waren aus der Arbeit von Frau SIGMUND bereits bekannt. In T 2 konnte die erste Aminosäure eindeutig als Asparaginsäure identifiziert werden. Zur vollständigen Klärung der Isoleucin/Leucin Positionen in T 2 diente die Aminosäureanalyse (Tab. 3). Drei Leucinreste stehen einem Isoleucin gegenüber. Da die Positionen 13 (Leucin), 16 (Leucin) und 21 (Isoleucin) schon festliegen (Sequenzierung von CB 1), bleibt für die dritte Position noch Leucin. T 2a ist N-terminal um ein Lysin länger als T 2, da Trypsin die Bindung Lysin/Asparaginsäure nicht vollständig gespalten hat. In dieser Fraktion war noch ein zweites Peptid (T 3) enthalten, von dem durch die Arbeit von Frau SIGMUND 17 Schritte bekannt waren. T 3 sollte zur vollständigen Sequenzierung mit Chymotrypsin nachgespalten werden (siehe unten). In T 15 konnten die 4. Aminosäure eindeutig als Tyrosin und die 14. als Methionin identifiziert werden. Damit war eine Überlappung zu CB 3 sehr wahrscheinlich, da nur das Bromcyanpeptid CB 3 (Spaltung nach Methionin) mit Arginin beginnt. T 20 konnte durch automatische Sequenzierung um 14 auf 18 Aminosäuren verlängert werden.

Völlig neu waren die Peptide T 12, T 12a und T 22. T 12a stellte sich als ein von chymotryptischer Nebenaktivität gespaltenen Teil von T 12 heraus. Da T 12a bis zum C-Terminus sequenziert werden konnte, war auch T 12 vollständig bekannt. In geringer Ausbeute mit Verunreinigung durch T 12 konnte das Peptid T 22 isoliert werden. Es ließ sich durch automatische Sequenzierung 15 Schritte weit bestimmen.

Die Fraktion T V (Abb. 17) bestand, wie schon T IV, aus einem komplizierten Peptidgemisch. Durch die Leistungsfähigkeit der HPLC konnten, neben einigen Peptiden, die schon in T IV gefunden worden waren, weitere neue isoliert werden:

T 21: Q-E-Y-G-R;
 T 1: D-A-V-T-V-A-S-H-V-R;
 T 22a: V-C-V-P-S-G-P-K;
 T 19: P-A-D-T-F-D-Y-R;
 T 16: K-P-L-Q-P-F-Q-D-
 T 6: I/L-P-D-I/L-I/L-S-
 T 13a: A-I/L-W-Q-W-I/L-Q-R;
 T 4/T 9: V-A-C-S-V-S-G-M-P-T-F-P-S-W-H-R;
 F-D-P-N-P-F-F-S-G-K;
 T 20a: T-V-P-Q-L-E-N-L-L-
 T 13: L-W-A-I-W-Q-E-L-Q-R;

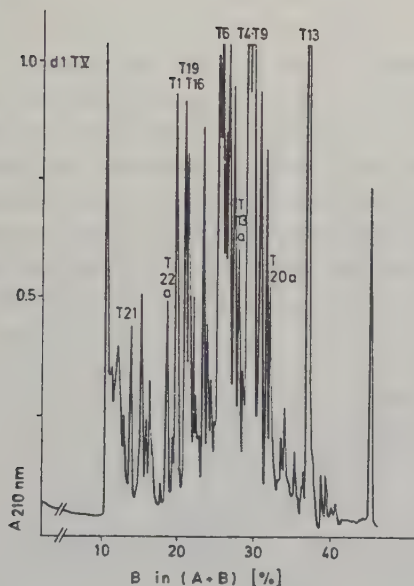


Abb. 17: Reversed-phase HPLC
 von Fraktion T V aus
 der Spaltung von
 Fragment d 1 mit
 Trypsin auf einer
 VYDAC TP/RP 10 Säule
 (4 x 250 mm) der
 Firma CHROMPACK,
 A: 0,1 % TFA, B: 80 %
 Acetonitril in A,
 Gradient von 0-70 % B
 in (A + B) in 50 min,
 Durchflußrate 2 ml pro
 Minute.

T 21 ist ein bisher nicht isoliertes Peptid. Da es nur fünf Aminosäuren lang war, konnte es von Hand bis zum C-Terminus sequenziert werden. Das Peptid T 1 ist das N-terminale Trypsinspaltstück von Fragment d 1 und bereits aus der Arbeit von Frau SIGMUND bekannt. Das nur acht Aminosäuren lange Peptid T 22a, durch automatische Sequenzierung bis zum C-terminalen Lysin bestimmt, konnte nicht eingeordnet werden. Peptid T 19 war schon von Frau SIGMUND ansequenziert worden und konnte jetzt um drei Aminosäuren verlängert werden. T 19 entsteht durch die partielle Spaltung der Arginin-Prolin Bindung an Position 260/261. Es konnten auch aus T I das Peptid T 18/T 19 und aus T II das Peptid T 18 isoliert werden. T 16 ist ein Peptid, das durch die Sequenzierung von CB 3 bekannt war; man beachte die ungespaltene Lysin-Prolin Bindung. T 6 wurde um zwei Aminosäuren verlängert; die Aminosäureanalyse (Tab. 3) zeigt, daß nur noch das C-terminale Lysin fehlt. T 13a wurde als aus einer chymotryptischen Nebenaktivität entstandenes Bruchstück identifiziert. T 13 war um zwei Aminosäuren länger und wurde zur sicheren Bestimmung der Tryptophan- und Zuordnung der Leucin-/Isoleucinreste maschinell sequenziert. T 13 bildet mit den drei C-terminalen Aminosäuren eine Überlappung zu CB 2 SP 7. Von großer Bedeutung für die Gesamtsequenz war die Sequenzierung von T 4, das mit T 9 verunreinigt war. T 4 etablierte die Überlappung von CB 1 und CB 2 und baute die bis dahin bekannte N-terminale Sequenz auf 101 Aminosäuren aus. T 9 wurde um drei Aminosäuren verlängert und damit bis zum C-Terminus sequenziert. Die unterschiedliche Menge von T 4 und T 9 in dieser Fraktion ließ beide Sequenzen durch Subtraktion leicht ermitteln. Dies gelang besonders gut bei der Identifizierung der PTH-Aminosäuren durch die HPLC. Durch eine chymotryptische Nebenaktivität entstand T 20a, das T 20 um sieben Aminosäuren verlängern konnte.

Die Auftrennung von Bereich T VI durch die HPLC (Abb. 18) führte zu mehreren kleineren Peptiden:

T 14: Y-R;
T 17: L-N-P-R;
T 21a: R-Q-E-Y-G-R;
T 17a: K-L-N-P-R;
T 7: A-T-Y-Y-N-S-R;

Abb. 18: Reversed-phase HPLC
 von Fraktion T VI aus
 der Spaltung von
 Fragment d 1 mit
 Trypsin auf einer
 VYDAC TP/RP 10 Säule
 (4 x 250 mm) der
 Firma CHROMPACK,
 A: 0,1 % TFA, B: 80 %
 Acetonitril in A,
 Gradient von 0-70 % B
 in (A + B) in 50 min,
 Durchflußrate 2 ml pro
 Minute.

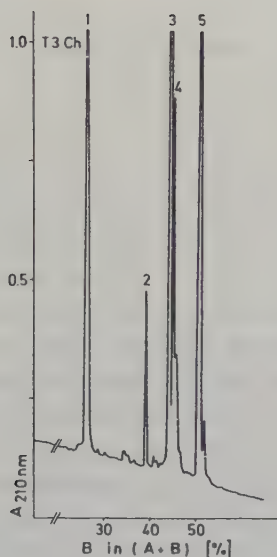
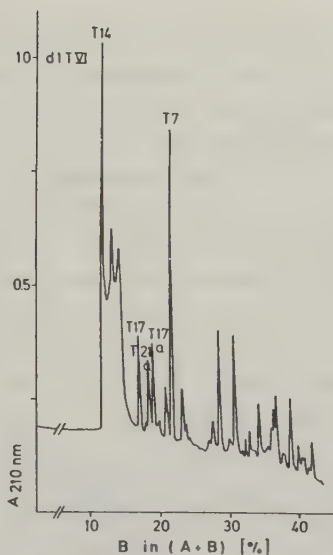


Abb. 19: Reversed-phase HPLC
 von T 3 nach der
 Spaltung mit Chymo-
 trypsin auf einer
 VYDAC TP/RP 10 Säule
 (4 x 250 mm) der
 Firma CHROMPACK,
 A: 0,1 % TFA, B: 80 %
 Acetonitril in A,
 Gradient von 0-70 % B
 in (A + B) in 50 min,
 Durchflußrate 2 ml pro
 Minute.

Das Dipeptid T 14 ist aus CB 2 SP 7 schon bekannt, ebenso wie die Peptide T 17 und T 17a aus CB 3. Hier war die Spaltung zwischen zwei Lysin-Resten unvollständig, wie auch zwischen den Resten Lysin/Arginin und Arginin bei T 21 und T 21a. Das Peptid T 7 konnte bis zum C-Terminus sequenziert, also um drei Aminosäuren verlängert werden.

Peptid T 3, das 25 Schritte weit sequenziert worden war (SIGMUND, 1983), wurde zur Bestimmung der restlichen Sequenz zusammen mit T 2a mit Chymotrypsin 5 Stunden gespalten. Das lyophilisierte Spaltgemisch wurde in zwei Portionen zu 100 µl auf die HPLC im TFA-System aufgetragen. Es entstand das Elutionsprofil aus Abb. 19. Die einzelnen Gipfel hatten folgende N-terminale Sequenzen:

T 3 Ch 1:	H-G-K-P-G-L-C-Q-H-E-G-H-K;
2:	E-N-I/L-A-
3:	S-A-F-I/L-
4:	K-D-I/L-D-
5:	S-A-F-I/L-

Von großer Bedeutung war T 3 Ch 1, das durch automatische Sequenzierung bis zum C-Terminus bestimmt werden konnte. Dieses Peptid konnte die Lücke zwischen den Positionen 53/54 schließen. Damit waren vom N-Terminus von Fragment d 1 101 Aminosäuren sequenziert.

Aus Abb. 20 geht die Bedeutung der aus der Spaltung von Fragment d 1 mit Trypsin und Nachspaltung von T 3 mit Chymotrypsin gewonnenen Peptide hervor. Peptide, die neue Sequenzinformationen lieferten, sind unterstrichen. Die durchgehend bestimmte N-terminale Sequenz hat sich auf 101 Aminosäuren verlängert, viele tryptische Peptide konnten verlängert oder neu sequenziert werden, so daß etwa 90 % der Positionen bestimmt waren. Trotzdem bestanden noch viele Lücken, die durch Überlappungen geschlossen werden mußten. Als nächste Spaltung von Fragment d 1 wurde die mit der Protease aus *Staphylococcus aureus* V 8 mit der Spezifität an Glutaminsäure gewählt. Die möglichen Spaltstellen sind in Abb. 20 mit † markiert. Durch Nachspaltung des Peptides CB 2 SP 2 (A-L-L-D-) mit Chymotrypsin kann eine Überlappung von T 5 zum nächsten tryptischen Peptid gebildet werden. Da T 9 vom bisher als

CB 2 SP 3 isolierten Peptid nur drei Aminosäuren mehr aufklären konnte, sollte die weitere Sequenzierung dieses Peptides den Anschluß des nächsten tryptischen Spaltstückes ergeben. Weitere Überlappungen zu tryptischen Peptiden oder Verlängerung von schon bekannten *S. aureus* Peptiden sollten das Bruchstück aus T 11 mit dem Beginn Q-A-, die Verlängerung von CB 2 SP 6 (V-I/L-H-N-A-I/L-H-), das Peptid mit dem Beginn A-D-C-A- aus T 15, das wahrscheinlich in CB 3 übergeht, sowie die Peptide mit dem Beginn N-L-L- aus T 20 und Y-G-R- aus T 21 bringen.

	T 1	T 2	T 3	T 4	T 5	T 6	T 7	T 9	T 10	T 11
C			0,4 (1)	0,7 (1)						
D	1,2 (1)	2,2 (2)	3,0 (2)		2,0 (2)	1,1 (1)	1,2 (0)	2,2 (1)	1,2 (1)	8,5 (4)
N			(1)				(1)	(1)		(5)
T	0,9 (1)	1,9 (2)	0,9 (1)	0,8 (1)			0,9 (1)		1,8 (2)	
S	1,2 (1)	1,4 (1)	2,2 (2)	2,6 (3)	3,3 (3)	1,2 (1)	1,2 (1)	0,6 (1)		0,7 (1)
E		2,1 (2)	4,5 (2)		5,4 (3)				1,1 (1)	9,2 (5)
Q			(3)		(2)					(4)
P		0,9 (1)	0,8 (1)	2,0 (2)	x (2)	1,0 (1)		1,9 (2)		x (2)
G			4,6 (3)	1,4 (1)	1,7 (1)		1,3 (0)	1,4 (1)	1,5 (1)	3,1 (2)
A	1,8 (2)	1,0 (1)	1,9 (2)	0,9 (1)	2,1 (2)		1,1 (1)		1,8 (2)	4,2 (4)
V	2,7 (3)			2,0 (2)	4,4 (4)				1,7 (2)	0,9 (1)
M				0,6 (1)						
I		1,1 (1)	2,0 (2)		2,1 (2)	1,0 (1)				1,2 (1)
L		3,2 (3)	2,2 (2)		3,2 (3)	2,2 (2)				5,7 (6)
Y			0,7 (1)		1,8 (2)		1,5 (2)			2,5 (3)
F			1,6 (2)	0,7 (1)	0,8 (1)			2,1 (3)		4,2 (5)
K			2,0 (2)		1,0 (1)	1,0 (1)		1,0 (1)		1,0 (1)
H	1,1 (1)		3,8 (4)	1,4 (1)	1,4 (1)					3,3 (3)
R	0,9 (1)	1,0 (1)		1,0 (1)			1,0 (1)		1,0 (1)	
W				(1)	(1)					(1)
I	(10)	(14)	(31)	(16)	(30)	(7)	(7)	(10)	(10)	(48)

Tab. 3: Aminosäurezusammensetzung der Peptide T 1 bis T 11 aus der Spaltung von Fragment d 1 mit Trypsin. In Klammern die Zahl der Aminosäuren aus der Sequenzierung. (x: Prolin konnte nicht bestimmt werden).

	T 12	T 13	T 14	T 15	T 16	T 17	T 18	T 19	T 20	T 21
C				x (1)						
D	4,2 (3)			3,4 (1)	1,2 (1)	1,2 (0)	2,2 (0)	1,9 (2)	4,3 (1)	
N	(1)			(2)		(1)	(2)		(3)	
T	1,7 (2)						0,8 (1)	1,1 (1)	1,8 (2)	
S	3,2 (3)						1,3 (1)		0,5 (0)	
E		3,2 (1)		1,1 (1)	2,2 (0)				5,2 (3)	2,0 (1)
Q		(2)			(2)				(2)	(1)
P	0,8 (1)			0,8 (1)	2,2 (2)	0,9 (1)		0,9 (1)	0,8 (1)	
G	2,2 (0)			1,8 (1)		0,6 (0)	1,3 (0)			1,4 (1)
A	1,9 (2)	0,9 (1)		2,2 (2)				1,1 (1)		
V	0,8 (1)								1,1 (1)	
M				0,5 (1)						
I		1,0 (1)		0,9 (1)			2,2 (2)			
L	2,2 (2)	2,0 (2)		2,2 (2)	1,0 (1)	1,2 (1)			5,2 (5)	
Y	1,5 (2)		0,5 (1)	0,7 (1)			0,7 (1)	0,6 (1)	1,5 (2)	0,6 (1)
F	3,3 (4)				0,8 (1)			0,7 (1)	0,6 (1)	
K					2,0 (2)	1,2 (1)			1,0 (1)	
H	2,2 (2)								3,3 (3)	
R	1,0 (1)	1,0 (1)	1,0 (1)	1,0 (1)		1,0 (1)	1,0 (1)	1,0 (1)		2,0 (2)
W		(2)								
I	(24)	(10)	(2)	(15)	(9)	(5)	(8)	(8)	(25)	(6)

	T 18/19	T 22	T 22a
C		0,4 (1)	0,3 (1)
D	4,2 (2)	3,1 (1)	
N	(2)	(2)	
T	1,9 (2)	1,0 (1)	
S	1,2 (1)	2,4 (2)	1,4 (1)
E		0,5 (0)	
Q			
P	0,8 (1)	1,9 (2)	1,6 (2)
G	0,6 (0)	3,5 (3)	2,2 (1)
A	1,0 (1)	2,3 (2)	
V		4,5 (5)	1,8 (2)
M			
I	1,9 (2)	1,5 (1)	
L		2,0 (2)	
Y	1,5 (2)	0,7 (1)	
F	0,8 (1)	1,6 (2)	
K		1,0 (1)	1,0 (1)
H		1,1 (1)	
R	2,0 (2)	0,5 (0)	
W			
I	(16)	(27)	(8)

Tab. 4: Aminosäurezusammensetzung der Peptide T 12 bis T 22a aus der Spaltung von Fragment d 1 mit Trypsin. In Klammern die Zahl der Aminosäuren aus der Sequenzierung (x: Cysteine konnte nicht bestimmt werden).

2. Spaltung des Fragments d 1 mit der Protease aus *Staphylococcus aureus*

Für die Spaltung mit der Protease aus *S. aureus* V 8 wurden 17 mg von Fragment d 1 eingesetzt. Das Peptidgemisch wurde auf eine Sephacryl S-200 sf Säule aufgetragen. Das Elutionsprofil in Abb. 21 zeigt vier verschiedene Gipfel, die über eine Trisacryl Säule entsalzt und anschließend lyophilisiert wurden.

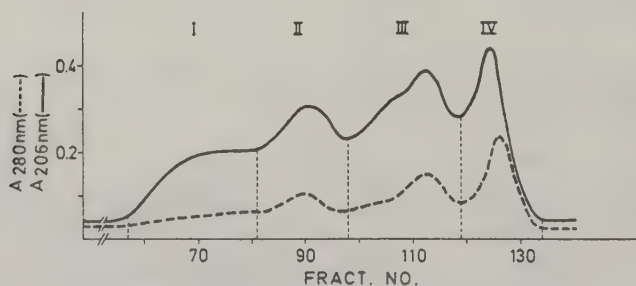


Abb. 21: Gelfiltration der Peptide von Fragment d 1 nach der Spaltung mit der Protease aus *Staphylococcus aureus* V 8 auf einer Sephacryl S-200 sf Säule (1,5 x 160 cm), äquiliibriert mit 8 M Harnstoff/HCl Puffer, pH 3,5.

Durchflußrate 4 ml pro Stunde, Fraktionsgröße 30 Minuten. Die weiterverarbeiteten Bereiche sind durch senkrechte Linien abgegrenzt.

Die vier Fraktionen wurden in 50 %-iger Ameisensäure gelöst und im TFA-System getrennt (Abb. 22 bis 25). Die einzelnen Gipfel wurden lyophilisiert und ansequenziert.

Aus SP I (Abb. 22) wurde ein Peptid isoliert, das für eine Überlappung wichtig war. Durch automatische Sequenzierung wurden 15 Positionen identifiziert. Damit konnten T 15 und CB 3 verbunden und die Leucin/Isoleucin Positionen geklärt werden:

SP 15: A-D-C-A-I-N-L-M-R-K-P-L-Q-P-F-

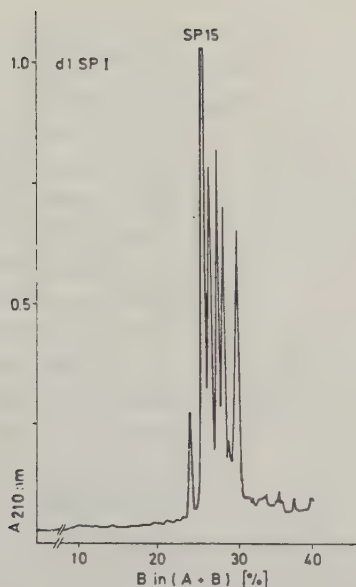


Abb. 22: Reversed-phase HPLC der Fraktion SP I aus der Spaltung von Fragment d 1 mit der Protease aus *Staphylococcus aureus* V 8. Die Trennung erfolgte auf einer VYDAC TP/RP 10 Säule (4 x 250 mm), der Firma CHROMPACK. A: 0,1 % TFA, B: 80 % Acetonitril in A, Gradient von 0-60 % B in (A + B) in 50 min, Durchflußrate: 2 ml pro Minute.

SP 15 ist ein sehr langes Peptid, - die Aminosäureanalyse in Tab. 5 zeigt über 40 Aminosäuren -, das wie schon CB 3 und T 18 durch die Zuckerseitenkette einen hydrophilen Charakter bekommt. SP 15 konnte die vermutete Überlappung von T 15 mit CB 3 bestätigen.

Die restlichen Gipfel der Fraktion SP I sind aus unspezifischen Spaltungen besonders zwischen den Positionen 252 (Arginin) und 253 (Asparagin mit Zuckerseitenkette) entstanden. Diese Stelle scheint besonders labil für verschiedene Proteasen, da Spaltungen auch mit Chymotrypsin auftraten.

Aus der Auftrennung von SP II (Abb. 23) durch die HPLC wurden drei Peptide isoliert:

SP 1: D-A-V-T-V-A-S-H-V-R-

SP 7: A-L-L-D-

SP 8: Q-R-F-D-P-N-P-F-F-S-G-K-V-A-G-E-D-A-V-T-T-R-D-P-Q-

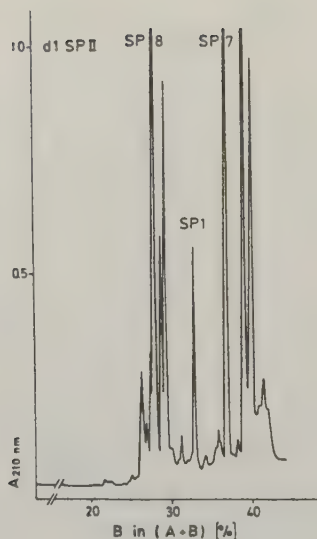
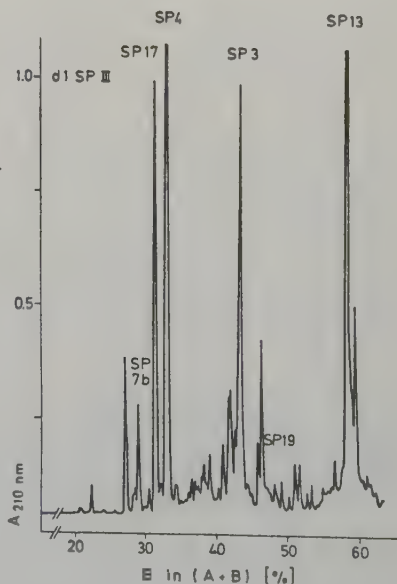


Abb. 23: Reversed-phase HPLC der Fraktion SP II aus der Spaltung von Fragment d 1 mit der Protease aus *Staphylococcus aureus* V 8. Die Trennung erfolgte auf einer VYDAC TP/RP 10 Säule (4 x 250 mm), der Firma CHROMPACK. A: 0,1 % TFA, B: 80 % Acetonitril in A, Gradient von 0-60 % B in (A + B) in 50 min, Durchflußrate 2 ml pro Minute.

Abb. 24: Reversed-phase HPLC der Fraktion SP III aus der Spaltung von Fragment d 1 mit der Protease aus *Staphylococcus aureus* V 8. Die Trennung erfolgte auf einer VYDAC TP/RP 10 Säule (4 x 250 mm), der Firma CHROMPACK. A: 0,1 % TFA, B: 80 % Acetonitril in A, Gradient von 0-70 % B in (A + B) in 50 min, Durchflußrate 2 ml pro Minute.



SP 1 ist das schon bekannte N-terminale Peptid von Fragment d 1. SP 7 trat in zwei Gipfeln auf, die sich, wie sich später herausstellen sollte, durch den C-Terminus unterscheiden. Beide Gipfel wurden für eine Nachspaltung mit Chymotrypsin vereinigt, da eine Sequenzierung dieses Peptids über die bisher bekannte Sequenz von 21 Aminosäuren hinaus nicht erfolversprechend schien. Peptid SP 8 wurde vom Sequenator 25 Schritte sequenziert und verband die tryptischen Peptide T 9, T 10 mit T 11 zu einem Fragment von 38 Aminosäuren. Die Bindung zwischen den Aminosäuren Glutaminsäure und Asparaginsäure in SP 8 wurde nicht gespalten.

Die Auftrennung von SP III (Abb. 24) führte zur Isolierung der folgenden Peptide, die zum Teil von entscheidender Bedeutung für die Gesamtsequenz waren:

SP 3: S-I/L-R-S-A-F-I/L-

SP 4: ~~N~~-I/L-A-S-F-

SP 7a: L-I-S-K-A-T-T-Y-N-S-R-E;

SP 13: V-L-H-N-A-L-H-S-W-L-G-G-H-A-K-Y-S-F-S-S-L-D-Y-T-A-F-D-P-

SP 17: I/L-N-H-Q-T-V-P-Q-I/L-

SP 19: Y-G-R-V-F-A-G-F-I/L-I/L-

SP 3 und SP 4 waren schon aus der Arbeit von Frau SIGMUND bekannt. Die Aminosäureanalyse von SP 3 (Tab. 5) bestätigt nochmals das Leucin an Position 24, das schon durch Subtraktion der bekannten Leucin- und Isoleucin-Positionen aus der automatischen Sequenzierung von CB 1 in der Aminosäureanalyse von T 2 erschlossen wurde. SP 7a wurde maschinell sequenziert, um die Leucin- und Isoleucinreste eindeutig zuordnen zu können. Zusätzlich konnte noch die C-terminale Glutaminsäure bestimmt werden. Dieses Peptid, aus einer Spaltung nach Asparaginsäure entstanden, konnte die tryptischen Peptide T 6 und T 7 verbinden. Die über T 7 hinausreichende Glutaminsäure konnte kein folgendes tryptische Peptid anschließen, da keines mit Glutaminsäure als erster Aminosäure bekannt war. Von großem Interesse war SP 13, das schon aus der Nachspaltung von CB 2 sieben Aminosäuren weit sequenziert worden war, da hier zwei Histidinreste durch drei Aminosäuren getrennt waren, eine Charakteristik der kupferbindenden Bereiche in Arthropodenhämocyaninen (GAYKEMA et al., 1984). SP 13 wurde durch automatische Se-

quenzierung 28 Schritte weit sequenziert. Dabei zeigte sich, daß SP 13 in T 12 hineinlief. Damit waren 39 Aminosäuren dieses Peptids bekannt; nach der Aminosäureanalyse ist es etwa 45 Aminosäuren lang (Tab. 5). SP 17 brachte keine neuen Sequenzinformationen, es liegt in T 20. SP 19 konnte T 21 und T 22 verbinden, da es aber wie auch schon T 22 nur in sehr geringer Ausbeute isoliert werden konnte, ließen sich nur 10 Schritte bestimmen.

Aus SP IV (Abb. 25) ließen sich die vier folgenden Peptide durch die HPLC darstellen:

SP 0: E-Y-R-D-A-V-T-
SP 5/6: G-H-K-V-A-C-
SP 14: I/L-Q-R-Y-R-G-I/L-P-Y-N-
SP 18: N-I/L-I/L-K-R-R-Q-

SP 0 bot eine Überraschung, es bildete eine Überlappung mit dem bisher sequenzierten N-Terminus von d 1 (D-A-V-T-V-) und verlängerte diesen um drei Aminosäuren. Dieses Peptid war nur in sehr geringer Menge isolierbar, woraus geschlossen wurde, daß der etwas längere N-Terminus der funktionellen Einheit d nur sehr selten auftritt. Bemerkenswert ist, daß die Bindung Glutaminsäure/Tyrosin nicht gespalten wurde. Die Protease aus *S. aureus* ist anscheinend nicht in der Lage, eine N-terminal stehende Glutaminsäure abzuspalten. Da die funktionelle Einheit d mit Trypsin aus dem Gesamtmolekül gespalten wurde, konnte N-terminal von der Sequenz D-A-V-T-V- die Aminosäure Lysin oder Arginin erwartet werden. SP 0 zeigt, daß Trypsin tatsächlich nach Arginin spaltet.

SP 5/6 und SP 14 waren schon aus vorhergehenden Spaltungen bekannt. Wie die Aminosäureanalyse (Tab. 5) von SP 5/6 zeigt, enthält dieses Peptid auch SP 6. Die Bindung der beiden Aminosäuren Glutaminsäure/Glutamin (Pos. 76/-77), aber auch die Bindung zwischen den beiden Glutaminsäureresten (Pos. 79/80), waren von der Protease nicht angegriffen worden. Die Sequenzierung von SP 18 brachte eine Überlappung zwischen T 20a und T 21.

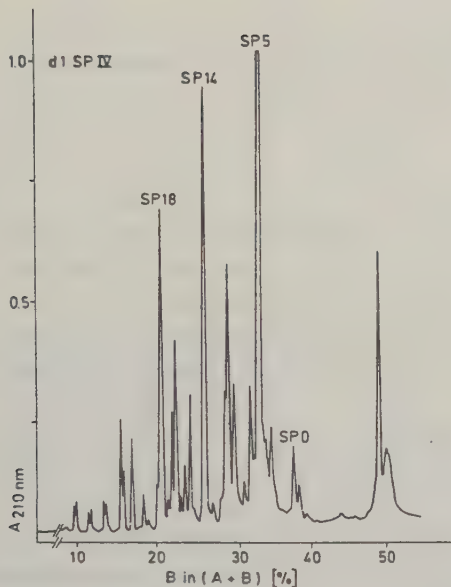


Abb. 25: Reversed-phase HPLC der Fraktion SP IV aus der Spaltung von Fragment d 1 mit der Protease aus *Staphylococcus aureus* V 8. Die Trennung erfolgte auf einer VYDAC TP/RP 10 Säule (4 x 250 mm), der Firma CHROMPACK. A: 0,1 % TFA, B: 80 % Acetonitril in A, Gradient von 0-60 % B in (A + B) in 50 min, Durchflußrate 2 ml pro Minute.

Zur Spaltung von SP 7 wurde das lyophilisierte, aus zwei Gipfeln vereinigte Peptid mit 4 µg Chymotrypsin versetzt und 5 Stunden inkubiert. Zur Trennung der Peptide durch die HPLC im TFA-System wurde in zwei Portionen zu je 100 µl aufgetragen und mit einem Gradienten von 0 - 60 % in 50 Minuten eluiert. Es entstand das in Abb. 26 dargestellte Schreiberbild. Die drei Gipfel wurden ansequenziert; es waren nur zwei N-terminal unterschiedliche Peptide zu identifizieren, die jedoch von verschiedener Länge waren.

SP 7 Ch 1: A-L-L-D-H-G-S-S-V-A-V-P-Y-

SP 7 Ch 2: F-D-W-I-S-P-I-Q-K-L-P-D-L-I-S-K-

SP 7 Ch 2a: F-D-W-I/L-S-P-I/L-Q-K-I/L-P-

Gipfel 1 enthielt das N-terminale Bruchstück von SP 7, während Gipfel 2 und 2a sich C-terminal um SP 7a unterschieden, das bei einem Teil von SP 7 abgespalten worden war. Damit ist auch verständlich, warum SP 7 in zwei verschiedenen Gipfeln in SP II auftrat. Die Peptide aus Gipfel 1 und 2 wurden automatisch sequenziert. Während SP 7 Ch 1 bis zum C-terminalen Tyrosinrest

bestimmt werden konnte, ließen sich von SP 7 Ch 2 16 Schritte nach automatischer Sequenzierung identifizieren. Dies reichte für eine Überlappung zu SP 7a aus.

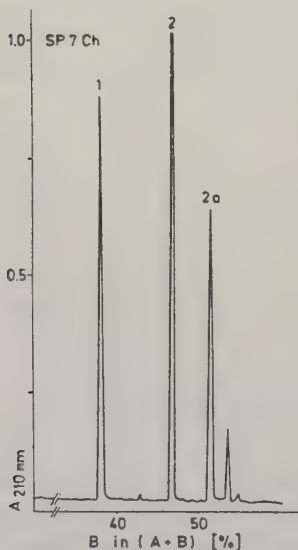


Abb. 26: Reversed-phase HPLC von SP 7 nach der Spaltung mit Chymotrypsin. Die Trennung erfolgte auf einer VYDAC TF/RP 10 Säule (4 x 250 mm), der Firma CHROMPACK. A: 0,1 % TFA, B: 80 % Acetonitril in A, Gradient von 0-60 % B in (A + B) in 50 min, Durchflußrate 2 ml pro Minute.

Abb. 27 zeigt zusammengefaßt die Ergebnisse aus der Spaltung von Fragment d 1 mit der Protease aus *Staphylococcus aureus*. Bis zu diesem Zeitpunkt waren 117 Aminosäuren des N-terminalen Teils, vier größere Bruchstücke mit 38, 39, 47 und 57 Aminosäuren und zwei acht Aminosäuren lange Peptide bekannt. Es konnten fast alle Peptide isoliert werden, die aufgrund der Spalt-spezifität erwartet wurden und für die Fortführung der Sequenz nützlich sein sollten (vgl. Abb. 27). Nicht gefunden wurden die kleineren Peptide SP 2, SP 9 bis SP 12 und SP 16. Da SP 10 nicht isoliert werden konnte, wurde zur weiteren Aufklärung der Sequenz als nächste Spaltung nochmals eine tryptische des Fragments d 1 vorgesehen, um T 11 zu isolieren und mehr als die 16 bekannten Schritte zu sequenzieren.

-3 -1
EYR
-SP 0

1 10 20 30 40 50
DAVT VASHVRK_†OLDTLTAGEIESLR_†SAFLD_†IQQDHTYENIASFHGKPGLC
-SP 1- -SP 3- -SP 4-

DAVT

51 60 70 80 90 100
QHEG_†HK_†VACSVSGMPTFPSWHR_†LYVEQVEEALLDHGSSVAVPYFDWISPI
-SP 5/6- -SP 7- FDWISPI
-SP 7 Ch 2-

101 110 120 130 140 150
LPD_†LLS ATYYNSR QRFDPNPFFSGK_†VAGEDAVTTR DPQPELFNNY
QK LISKATYYNSR QRFDPNPFFSGK VAGEDAVTTRDPQ
QKLPDLISK QRFDPNPFFSGK VAGEDAVTTRDPQ
↑ -SP 7a- ↑ -SP 8- ↑

151 160 170 180 190 200
EYEQA QDNFDDFE VLHNA_†LH YSFSSLDYTA FDP
VLHNA_†LH YSFSSLDYTA FDP
-SP 13- ↑

201 210 220 230 240 250
VFFLHHANTDR_† LWAIWQELQRYRGLPYNEADCA_†LN_†MR RKPLQPFQDK_†K_†LN
-SP 14- -SP 15- ↑ ADCAINMRKPLQPF

251 260 270 280 290 300
PR_†NITNIYSR_†PADTFDYR_† NHFHVEYDTLELNHQTVPLENLL RQEYGR
-SP 17- -SP 18- -SP 19-
N_†LKRRQ_†YGR_†

301 310 320 330
VFAGFLIHNNGLSAD VCVPSGPK_†
VFAGFLI

Abb. 27: Teilsequenzen des Fragments d 1 nach der Spaltung mit der Protease aus *Staphylococcus aureus* und Nachspaltung von SP 7 mit Chymotrypsin. Peptide, die zur Fortführung der Gesamtsequenz beitrugen, sind unterstrichen. Mit † markiert sind die Spaltstellen von Trypsin. T 11 (ab Position 140) sollte in der folgenden Aufarbeitung nochmals isoliert und sequenziert werden.

	SP 1	SP 3	SP 4	SP 5/6	SP 7	SP 8	SP 9	SP 13	SP 14	SP 15
C			0,3 (1)	0,3 (1)						0,2 (1)
D	3,2 (3)	2,3 (2)	1,0 (0)	0,7 (0)	4,1 (3)	1,1 (0)	4,0 (3)	4,5 (3)	(0)	8,5 (4)
N			(1)		(1)	(1)	(1)	(2)	1,0 (1)	(5)
T	2,5 (3)	0,8 (1)		1,0 (1)	1,0 (1)	0,9 (1)	1,7 (2)	1,6 (2)		1,7 (2)
S	1,3 (1)	2,1 (2)	1,0 (1)	3,1 (3)	4,2 (5)	2,0 (2)	1,7 (1)	4,0 (4)		1,3 (1)
E	1,0 (1)	2,7 (1)	1,7 (1)	4,2 (3)	2,0 (1)	0,9 (1)	4,0 (2)	2,0 (1)	1,9 (1)	2,5 (1)
Q		(2)	(1)	(1)	(1)		(2)	(1)	(1)	
P			0,8 (1)	1,5 (2)	2,2 (3)		x (4)	0,7 (1)	0,7 (1)	x (4)
G	2,5 (1)	0,9 (0)	2,1 (2)	3,2 (2)	4,3 (1)	0,6 (0)	3,3 (2)	2,7 (2)	1,2 (1)	
A	2,7 (3)	0,6 (1)	0,8 (1)	1,0 (1)	1,0 (3)	0,8 (1)	2,0 (2)	4,3 (5)		2,5 (3)
V	3,3 (3)	0,4 (0)		3,9 (4)	1,8 (2)		2,1 (2)	1,7 (2)		
M				0,3 (1)						0,9 (1)
I		1,0 (1)	0,9 (1)		2,4 (3)	0,9 (1)		0,9 (1)		3,0 (3)
L	2,2 (2)	2,2 (2)	1,0 (1)	1,0 (1)	4,0 (4)	1,1 (1)		5,7 (6)	2,1 (2)	3,1 (3)
Y		0,6 (1)		0,6 (1)	2,5 (3)	1,6 (2)		1,6 (2)	1,5 (2)	1,5 (3)
F		0,9 (1)	0,8 (1)	0,6 (1)	0,9 (1)		2,5 (3)	3,4 (4)		2,5 (3)
K	1,2 (1)		1,4 (1)	1,3 (1)	1,7 (2)	1,3 (1)	1,0 (1)	1,0 (1)		3,0 (3)
H	1,1 (1)	1,3 (1)	2,3 (2)	1,6 (2)	1,0 (1)			5,1 (5)		2,2 (2)
R	1,2 (1)	1,0 (1)		1,0 (1)	1,3 (1)	1,3 (1)	2,1 (2)	1,2 (1)	1,8 (2)	2,7 (4)
W				(1)	(1)			(3)		
I	(20)	(16)	(15)	(27)	(37)	(12)	(27)	(46)	(11)	(45)
	SP 17		SP 18		SP 19					
C					0,7 (1)					
D	1,1 (0)		1,1 (0)		2,7 (1)					
N	(1)		(1)		(2)					
T	0,8 (1)				1,0 (1)					
S					2,1 (2)					
E	2,7 (1)		2,0 (1)							
Q	(2)		(1)							
P	0,8 (1)				1,9 (2)					
G					5,2 (4)					
A					1,9 (2)					
V	1,1 (1)				4,4 (5)					
M										
I					1,1 (1)					
L	2,2 (2)		2,1 (2)		1,9 (2)					
Y					1,8 (2)					
F					1,7 (2)					
K			1,3 (1)		1,0 (1)					
H	1,0 (1)				0,9 (1)					
R			2,0 (2)		2,1 (2)					
W										
I	(10)		(8)		(30)					

Tab. 5: Aminosäurezusammensetzung von Peptiden aus der Spaltung von Fragment d 1 mit der Protease aus *S. aureus*. In Klammern die Zahl der Aminosäuren aus der Sequenzierung (x: Prolin konnte nicht bestimmt werden).

4. Isolierung des Peptids T 11 aus der zweiten Spaltung des Fragments d 1 mit Trypsin

Für die zweite Trypsinspaltung wurden 17 µg des Fragments d 1 unter den gleichen Bedingungen wie bei der ersten Spaltung behandelt. Das Spaltgemisch wurde auf eine Sephacryl S-200 sf Säule aufgetragen. Es wurde das in Abb. 28 wiedergegebene Elutionsprofil gewonnen, das sich nur geringfügig von dem der ersten Trypsinspaltung (Abb. 13) unterschied. Zur weiteren Auftrennung wurden sechs verschiedene Fraktionsbereiche vereinigt.

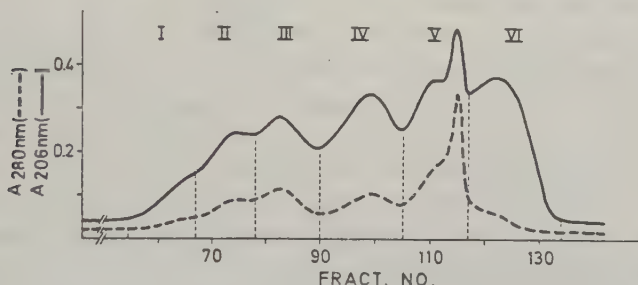


Abb. 28: Gelfiltration der Trypsinpeptide des Fragments d 1 über eine Sephacryl S-200 sf Säule (1,5 x 160 cm), äquilibriert mit 8 M Harnstoff, pH 3,5 (mit HCl eingestellt). Durchflußrate: 4 ml pro Stunde. Fraktionsgröße 30 Minuten. Die weiterverarbeiteten Fraktionsbereiche sind durch senkrechte Linien abgegrenzt.

Da bei der ersten Auftrennung der tryptischen Peptide das Peptid T 11 aus der Fraktion I isoliert werden konnte, wurde es in der zweiten Auftrennung in den beiden Fraktionen I und II gesucht. Dazu wurden sie im TFA-System mit der HPLC getrennt. Die Abbildungen 29 und 30 zeigen die erhaltenen Elutionsprofile. Es wurde in jeder Trennung ein Hauptgipfel isoliert, der ansequenziert wurde.

T I enthielt T 18/19 mit der Anfangssequenz X-I/L-T-N-I/L-, also das tryptische Peptid, an dem die Kohlenhydratseitenkette befestigt ist. Aus T II wurde T 11, das gesuchte Peptid, isoliert. Im Gegensatz zur ersten Trennung der tryptischen Peptide durch die Gelfiltration waren T 18/19 und T 11 getrennt. Von T 11 wurden durch die automatische Sequenzierung 35 Aminosäuren bestimmt:

D-P-Q-P-P-E-L-F-N-N-N-Y-F-Y-E-Q-A-L-Y-A-L-E-Q-D-N-F-D-D-F-E-I-Q-F-E-V-L-

Diese Sequenz brachte einen großen Fortschritt für die Gesamtsequenz, da es bis in SP 13 lief; gleichzeitig wurde das Peptid CB 2 SP 6 (SP 11) eingeordnet. T 11 schließt zwei kurze Peptide (SP 10 und SP 12) ein, die durch Spaltung mit der *S. aureus* Protease entstehen, aber nicht isoliert werden konnten. Wie aus Abb. 31 zu ersehen ist, waren von Fragment d 1 nun vier große Bruchstücke mit 117, 94, 57 und 47 sowie ein Peptid von acht Aminosäuren vollständig sequenziert.

In der nächsten Aufarbeitung sollte eine Spaltung der säurelabilen Peptidbindungen durchgeführt werden. Wie an Peptiden der Bromcyanspaltung beobachtet werden konnte, werden bei Spaltung mit 70 %-iger Ameisensäure alle Peptidbindungen zwischen den Aminosäuren Asparaginsäure und Prolin zumindest partiell gespalten. In Abb. 31 sind diese Spaltstellen mit Pfeilen markiert. Von großem Interesse war das Peptid ab Position 200 mit dem Beginn P-V-F-F- (AC 4) und einem erwarteten Molekulargewicht von etwa 15000 D, das, falls mehr als 12 Schritte sequenzierbar wären, eine Überlappung zum nächsten tryptischen Peptid erzielen konnte.

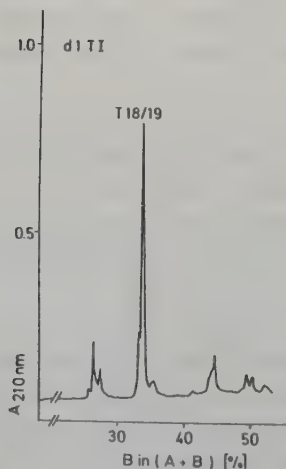


Abb. 29: Reversed-phase HPLC der Fraktion T I aus der zweiten Spaltung von Fragment d 1 mit Trypsin. Die Trennung erfolgte auf einer VYDAC TP/RP 10 Säule (4 x 250 mm), der Firma CHROMPACK, A: 0,1 % TFA, B: 80 % Acetonitril in A, Gradient von 0-70 % B in (A + B) in 50 min, Durchflußrate 2 ml pro Minute.

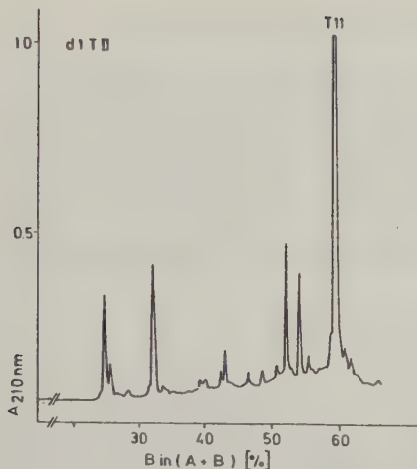


Abb. 30: Reversed-phase HPLC der Fraktion T 11 aus der zweiten Spaltung von Fragment d 1 mit Trypsin. Die Trennung erfolgte auf einer VYDAC TP/RP 10 Säule (4 x 250 mm), der Firma CHROMPACK, A: 0,1 % TFA, B: 80 % Acetonitril in A, Gradient von 0-70 % B in (A + B) in 50 min, Durchflußrate 2 ml pro Minute.

-3-
EYR

1	10	20	30	40	50
DAVTVAHVVRKDLDTLTAGEIESLRSAFLDIQQDHTYENIASFHGKPGLC					
51	60	70	80	90	100
QHEGHNKVVACSVSGMPTFPSWHRLYVEQVEEALLDHGSSVAVPYFDWISPI					
101	110	120	130	140	150
QKLPDLISKATYYNSRE					
<u>QRFDPNPPFFSGKVAGEDAVTTROPPQPELFNNNY</u> -T 11-					
151	160	170	180	190	200
FYEQA QDNFDDFE VLHNALHSVLGGHAKYSFSSLDYTAFD _P					
<u>FYERALYALQDNFDDFEIQFEVI</u>					
201	210	220	230	240	250
VFFLHHANTOR LVAIWQELQRYRGLPYNEADCAINLMRKPLQPFQDKKLN					
251	260	270	280	290	300
PRNITNIYSRPA _D TFDYR NHFHVEYDTLELNHQTVPQLENLLKRRQEYGR					
301	310	320	330		
VFAGFLIHNNGLSAD VCVPSGPK					

Abb. 31: Teilsequenzen des Fragments d 1 nach der zweiten Spaltung mit Trypsin und Sequenzierung des Peptids T 11. T 11 ist unterstrichen. Die säurelabilen Asparaginsäure/Prolin Stellen sind mit Pfeilen (†) markiert.

5. Spaltung des Fragments d 1 mit Säure und mit Chymotrypsin

Für die Spaltung des Fragments d 1 mit Säure wurden die Bedingungen der Bromcyanspaltung gewählt. Zur Auftrennung des Peptidgemischs diente eine Sephacryl S-200 sf Säule. Als Elutionsprofil ergab sich das in Abb. 32 dargestellte Bild. Die Fraktionen der Gipfel I, II und IIIa/IIIb wurden vereinigt, entsalzt und lyophilisiert. Proben aus den Gipfeln I, II, IIIa und IIIb wurden mit der SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese auf ihr Molekulargewicht untersucht (Abb. 33).

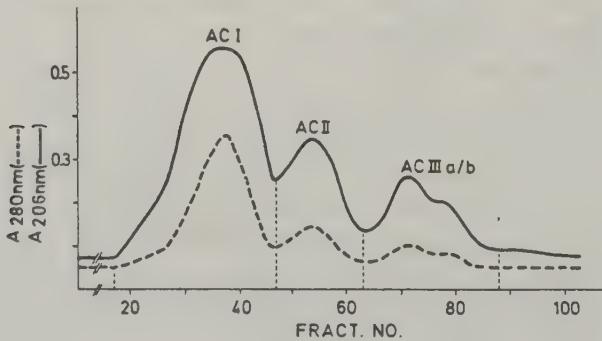


Abb. 32: Gelfiltration der Peptide von Fragment d 1 nach Spaltung mit Ameisensäure auf einer Sephacryl S-200 sf Säule (1,5 x 160 cm) äquilibriert mit 8 M Harnstoff/HCl Puffer, pH 3,5. Durchflußrate 4 ml pro Stunde. Fraktionsgröße 30 Minuten.

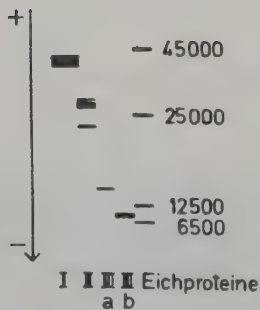


Abb. 33: Schematische Darstellung der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese der Fraktionen aus Abb. 32, nach LAEMMLI (1970), 10 bis 20 % Acrylamid im Gel.

Es stellte sich heraus, daß Gipfel I das ungespaltene Fragment d 1 mit dem Molekulargewicht von etwa 43000 D ist. Gipfel II enthielt Peptide mit Molekulargewichten von 20 - 29000 D, Gipfel IIIa von 15000 D und IIIb von 10000 D. Entsprechend vielfältig waren die N-terminalen Aminosäuren der einzelnen Fraktionen. Da der Beginn der Säurespaltstücke aus der Bromcyan-spaltung schon bekannt war, ließen sie sich trotzdem zuordnen:

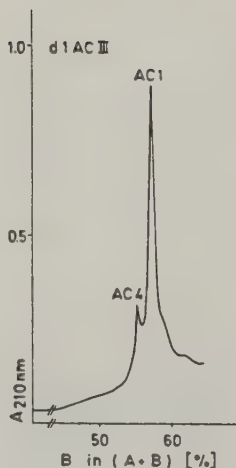
AC I:	D-A-V-T-
AC II:	D-A-V-T-
	P-N-P-F-
	P-Q-P-E-
	(P-V-F-F)-
AC III:	D-A-V-T-
	P-V-F-F-

Das gesuchte Peptid war in den Fraktionen AC II und AC III nur in relativ geringer Menge vertreten, was auf eine niedrige Ausbeute der Säurespaltung an Position 199/200 schließen läßt. Trotzdem wurde versucht AC 4 mit Hilfe der HPLC zu isolieren.

Die Fraktion AC III wurde mit der HPLC im TFA-System getrennt. Wie Abb. 33 zeigt, konnte eine Trennung erreicht werden. Beide Gipfel wurden ansequenziert, der erste enthielt AC 4, der zweite AC 1. Mit AC 4 wurde eine automatische Sequenzierung versucht, das Peptid konnte aber nur acht Schritte weit, die schon bekannt waren, abgebaut werden.

Nachdem die Isolierung und Sequenzierung von AC 4 für die Schließung der Lücke 211/212 kein Erfolg war, bestand noch die Möglichkeit, mit Hilfe einer Spaltung mit Chymotrypsin die fehlende Überlappung zu finden. Eine Spaltstelle, die von Chymotrypsin angegriffen wird, liegt nach dem Phenylalaninrest an Position 204. Zur Spaltung bot sich das Material von Fraktion AC II (Abb. 32, etwa 3 mg) an, das aus Peptiden bestand, die die gesamte Sequenz von Fragment d 1 abdecken. Da Chymotrypsin nach aromatischen Aminosäuren wie Tyrosin, Phenylalanin und Tryptophan, aber auch nach Leucin und Glutamin in unterschiedlichen Ausbeuten spaltet, wurde eine große Zahl

Abb. 34: Reversed-phase HPLC
 der Fraktion AC III
 aus der Spaltung von
 Fragment d 1 mit 70
 %-iger Ameisensäure.
 Die Trennung erfolgte
 auf einer VYDAC TP/RP
 10 Säule (4 x 250
 mm), der Firma CHROM-
 PACK,
 A: 0,1 % TFA, B: 80 %
 Acetonitril in A,
 Gradient von 0-70 % B
 in (A + B) in 50 min,
 Durchflußrate 2 ml pro
 Minute.



von Peptiden erwartet. Es bestand aber gleichzeitig die Gelegenheit, weitere Peptide für noch fehlende Überlappungen zu finden, z. B. bei einer Spaltung nach Tyrosin an der Position 113.

Das Spaltgemisch der Fraktion AC II wurde über die HPLC im TFA-System aufgetrennt. Ergebnis war das in Abb. 35 dargestellte sehr komplexe Elutionsprofil. Mehr als 50 verschiedene Fraktionen wurden gesammelt, lyophilisiert und ansequenziert. In den seltensten Fällen war in einem der Gipfel nur ein Peptid. Da jedoch viele Peptide aus den schon vorhandenen Sequenzen abgeleitet werden konnten, mußten nur wenige Fraktionen, die unbekannte Peptide oder Peptide mit Sequenzen, die wichtig erschienen, enthielten, im Acetat-System durch die HPLC weiter aufgetrennt werden. Durch die veränderte Ladung bei pH 6,0 im Acetatspuffer ließen sich viele Peptide sauber isolieren. Folgende Peptide, die bis auf Ch 1 aus Gipfeln der in Abb. 36 dargestellten Schreiberbilder isoliert werden konnten, waren für die Fortführung der Sequenz von Fragment d 1 von Bedeutung:

Ch 1: N-S-R-E-Q;
 Ch 2: L-H-H-A-N-T-D-R-L-W;
 Ch 3: D-Y-R-N-H-
 Ch 4: R-N-H-F-H-
 Ch 5: K-R-R-Q-E-
 Ch 6: S-A-D-V-T-V-Y;
 Ch 7: V-C-V-P-S-G-P-K;

Ch 1 konnte ohne Nachreinigung sequenziert werden. Das Peptid beginnt an Position 114 und reicht nur um die Aminosäure Glutamin über die schon bekannte Sequenz hinaus. Da SP 8 mit Glutamin beginnt, konnte die Möglichkeit in Erwägung gezogen werden, daß zwischen den beiden Bruchstücken kein Peptid mehr fehlt. Ch 2 brachte die Überlappung an den Positionen 211/212. Dieses Peptid konnte durch maschinelle Sequenzierung bis zum C-terminalen Tryptophan aufgeklärt werden. Durch die unvollständige Spaltung der Peptide Ch 3 und 4 wurde auch die Überlappung an den Positionen 268/269 erreicht. Eine zusätzliche Bestätigung der Überlappung an den Positionen 297/298 (SP 18 und T 21) brachte die Sequenzierung von Ch 5. Mit Ch 6, das maschinell bis zum C-Terminus sequenziert werden konnte, gelang eine Verlängerung von T 22, dem C-terminalen Peptid von Fragment d 1. Von Interesse war auch die Sequenz von Ch 7, das mit dem bisher nicht eingeordneten Peptid T 22a aus der Spaltung mit Trypsin identisch war. Da auch Ch 7 mit der Aminosäure Lysin endete, für ein Peptid aus einer Spaltung mit Chymotrypsin eine ungewöhnliche Aminosäure, wurde geschlossen, daß Ch 7 den C-Terminus von Fragment d 1 bildet.

Aus der Abb. 37 ist ersichtlich, daß nach der Spaltung mit Chymotrypsin fast die gesamte Sequenz von Fragment d 1 aufgeklärt war. Nur noch zwei Überlappungen mußten ermittelt werden: Die Positionen 118/119 und 319/320. Zur Klärung an Position 118/119 sollte eine Spaltung mit der Endoproteinase Lys-C aus *Lysobacter enzymogenes* dienen, da eine mögliche Spaltung nach dem Lysinrest an Position 109 ein Peptid entstehen ließe, das dann nach acht Schritten Sequenzierung neue Informationen liefern könnte. Die Überlappung 319/320 sollte aus einer Nachspaltung von CB 3 ermittelt werden.

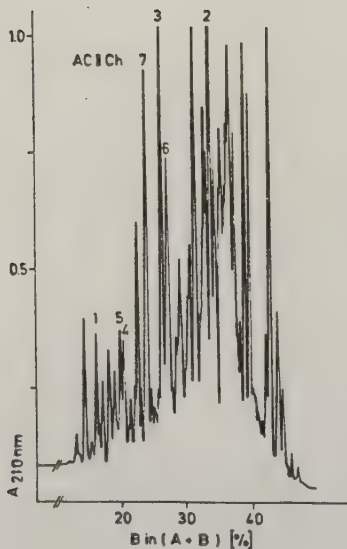
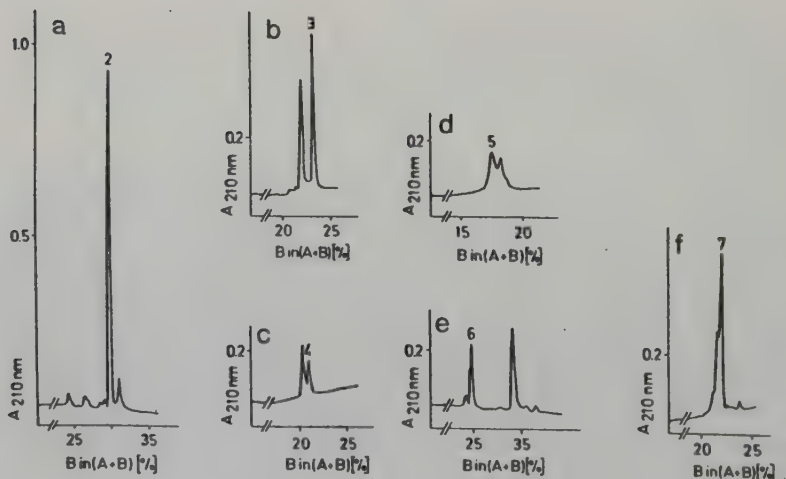


Abb. 35: Reversed-phase HPLC der Fraktion AC II nach Spaltung mit Chymotrypsin. Die Trennung erfolgte auf einer VYDAC TF/RP 10 Säule (4 x 250 mm), der Firma CHROMPACK, A: 0,1 % TFA, B: 80 % Acetonitril in A, Gradient von 0-70 % B in (A + B) in 50 min, Durchflußrate 2 ml pro Minute.

Abb. 36 (Text S. 57):



-3
EYR

1	10	20	30	40	50
DAVTVAHVVRK _↑ DLDTLTAGEIESLRSAFLDIQQDHTYENIASFHGK _↑ PGLC					
51	60	70	80	90	100
QHÉGHK _↑ VACSVSGMPTFPSPWHRLYVEQVEEALLDHGSSVAVPYFDWISPI					
101	110	120	130	140	150
QK _↑ L _↑ PDLISK _↑ KATYYNSREQRFDPNPFFSGK _↑ VAGEDAVTTTRDPQPELFNNNY					
<u>NSREQ</u>					
-Ch 1-					
151	160	170	180	190	200
FYEQALYALEQDNFDDFEIQFEVLHNAHLSWLGGHAK _↑ YSFSSLDYTA FDP					
201	210	220	230	240	250
VFFLHHANTDR _↑ LWAIWQELQRYRGLPYNEADCAINLMRK _↑ PLQPFQDK _↑ K _↑ LN					
<u>LHHANTDRIW</u>					
-Ch 2-					
251	260	270	280	290	300
PRNITNIYSRPA DTFDYR _↑ NHFHYEYDTLELNHQTVPQLENLLK _↑ RRQEYGR					
<u>RWHFH</u>					
<u>DYRNH</u>					
-Ch 3--Ch 4-					
-Ch 5-					
301	310	320	330		
VFAGFLIHNNGLSAD _↑ VCVPSGPK					
<u>SADVTVY</u>					
-Ch 6- -Ch 7-					

Abb. 37: Teilsequenzen des Fragments d 1 nach der Spaltung mit 70 %-iger Ameisensäure und Chymotrypsin. Die Peptide, die neue Informationen lieferten, sind unterstrichen. Die Spaltstellen für eine Spaltung mit der Protease Lys-C sind mit Pfeilen (↑) markiert.

Abb. 36: Nachreinigung von Peptiden aus der Trennung im TFA-System nach der Spaltung von AC II mit Chymotrypsin auf einer SERVA RP 18, 5 µ Säule (4,6 x 250 mm),
 A: 0,05 M Ammoniumacetat, pH 6,0, B: 60 % Acetonitril in A, pH 6,0, Durchflußrate: 2 ml pro Minute.
 a: 20-60 % B (A+B) (30 Min.), b: 10-50 % B (A+B) (40 Min.),
 c: 0-50 % B (A+B) (45 Min.), d: 0-70 % B (A+B) (50 Min.),
 e: 0-70 % B (A+B) (40 Min.), f: 0-50 % B (A+B) (45 Min.).

6. Die beiden letzten Lücken im Fragment d 1

a. Spaltung des Fragments d 1 mit der Endoproteinnase Lys-C aus *Lysobacter enzymogenes*

Für die Spaltung mit der Endoproteinnase Lys-C aus *Lysobacter enzymogenes* wurden 15 mg des Fragments d 1 eingesetzt. Das Peptidgemisch wurde auf einer Sephacryl S-200 sf Säule getrennt (Abb. 38).

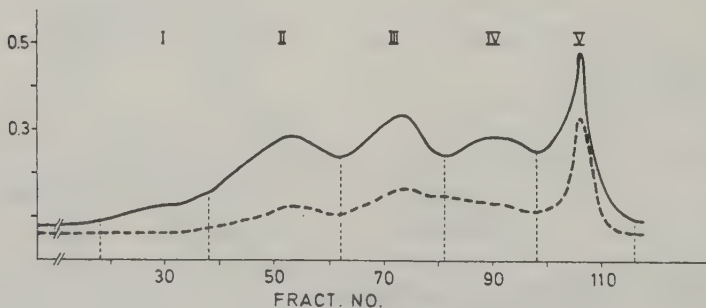


Abb. 38: Gelfiltration der Peptide des Fragments d 1 nach Spaltung mit Endoproteinnase Lys-C aus *Lysobacter enzymogenes* auf einer Sephacryl S-200 sf Säule (1,5 x 160 cm) äquilibriert mit 8 M Harnstoff/HCl Puffer, pH 3,5. Durchflußrate 4 ml pro Stunde. Fraktionsgröße 30 Minuten.

Die fünf Bereiche aus der Gelfiltration wurden entsalzt, lyophilisiert und ansequenziert. Im Bereich V ließ sich die gesuchte Sequenz identifizieren, so daß dieser weiter aufgetrennt wurde. Dies geschah mit Hilfe der HPLC im TFA-System. Das lyophilisierte Peptidgemisch wurde in Ameisensäure gelöst und in drei Portionen aufgetragen (Abb. 39). Die einzelnen Gipfel wurden ansequenziert. Das gesuchte Peptid hatte folgende Sequenz:

K 1: A-T-Y-Y-N-S-R-Q-R-F-D-P-N-P-F-F

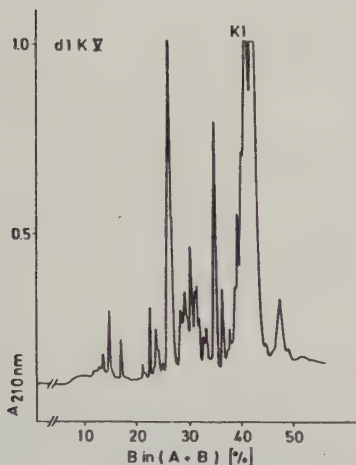


Abb. 39: Reversed-phase HPLC der Fraktion K V aus der Spaltung von Fragment d 1 mit der Endoproteinase Lys-C aus *Lysobacter enzymogenes*. Die Trennung erfolgte auf einer VYDAC TP/RP 10 Säule (4 x 250 mm), der Firma CHROMPACK, A: 0,1 % TFA, B: 80 % Acetonitril in A, Gradient von 0-70 % B in (A + B) in 50 min, Durchflußrate 2 ml pro Minute.

Damit war die Überlappung an den Positionen 117/118 geklärt und von Fragment d 1 eine durchgehende Sequenz von 319 Aminosäuren bekannt. Isoliert stand nur noch ein Peptid von acht Aminosäuren Länge (V-C-V-P-S-G-P-K), das als der C-Terminus des Fragments d 1 angesehen wurde, da es nicht nur aus der Spaltung mit Trypsin, sondern auch aus derjenigen mit Chymotrypsin jeweils mit der C-terminalen Aminosäure Lysin hervorging.

b. Die letzte Lücke in Fragment d 1

Als Ausgangsmaterial für eine Klärung der Überlappung an den Positionen 319/320 diente das Peptid CB 3, das, wie schon bei der Bromcyanspaltung von Fragment d 1 beschrieben, durch Gelfiltration und HPLC isoliert wurde. Nach einer Reihe von Vorversuchen mit verschiedenen Spaltmethoden erwies sich eine Spaltung mit verdünnter Salzsäure als die Methode der Wahl. Nach INGLIS *et al.* (1980) spaltet verdünnte Salzsäure vorwiegend nach der Aminosäure Asparaginsäure.

Etwa 1 mg CB 3 wurde in 300 μ l 0,02 M HCl gelöst und für zwei Stunden unter Stickstoffatmosphäre bei 110 °C inkubiert. Nach Verdünnung der Lösung mit 300 μ l Wasser wurde das Peptidgemisch lyophilisiert. Zur Vortrennung der Saurespaltstücke wurde eine Gelfiltration auf einer TSK G 2000 SW-Säule der Firma LKB gewählt. Das aufgetragene Volumen war 100 μ l; bei einem Durchfluß von 10 ml pro Stunde wurde das in Abb. 40 dargestellte Elutionsprofil gewonnen. Es wurden vier Fraktionen gebildet, die lyophilisiert und ansequenziert wurden. Dabei stellte sich heraus, daß die Fraktionen I und II mit R-K-P-, der N-terminalen Sequenz von CB 3, begannen, es sich also um ungespaltenes oder nur zum Teil gespaltenes Material handelte. Aus der Fraktion III konnten fünf verschiedene Peptide identifiziert werden, die alle schon bekannt waren:

CB 3 AC III: R-K-P-L-Q-
 K-K-L-N-P-
 P-R-X-I-T-
 Y-R-N-H-F-
 T-L-E-L-N-

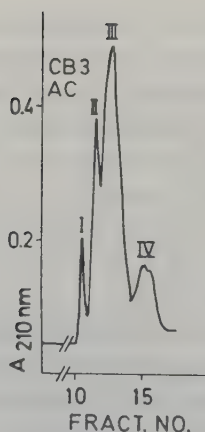


Abb. 40: Gelfiltration der Säurespaltstücke von CB 3 auf einer LKB Ultropac TSK G 2000 SW-Säule (7,5 x 600 mm), Vorsäule: LKB Ultropac TSK SWP (7,5 x 75 mm) in 0,05 %-iger TFA, Durchflußrate 10 ml pro Stunde.

Alle Spaltungen fanden nach Asparaginsäure statt, bis auf die Spaltung an Position 250, an der in der Sequenz ein Asparagin bestimmt worden war. Möglicherweise war das Asparagin während der Säurebehandlung desaminiert worden, so daß eine Spaltung stattfinden konnte.

Von noch größerem Interesse war die Fraktion IV, hier konnten vier Peptide identifiziert werden:

CB 3 AC IV: R-K-P-L-Q-
 P-R-X-I-T-
 T-F-D-Y-R-
 V-T-V-Y-V-

Neben den beiden schon in Fraktion AC III enthaltenen Peptiden R-K-P-L-Q- und P-R-X-I-T- waren hier die noch fehlenden Peptide, die aus einer Spaltung nach Asparaginsäure entstehen sollten, vertreten, darunter auch das Peptid mit der Anfangssequenz V-T-V-Y-. Deshalb wurde Fraktion IV mit der HPLC im TFA-System weiter aufgetrennt. Aufgetragen in 100 µl 50 %-iger Ameisensäure entstand das in Abb. 41 dargestellte Schreiberbild.

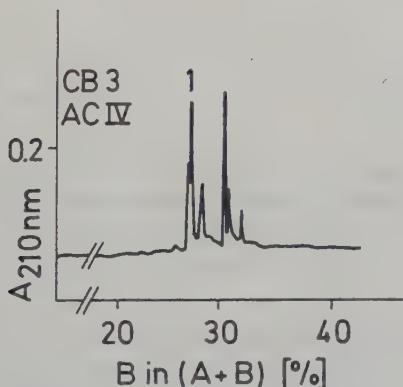


Abb. 41: Reversed-phase HPLC der Fraktion CB 3 AC IV aus der Spaltung von CB 3 mit verdünnter Salzsäure. Die Trennung erfolgte auf einer VYDAC TP/RP 10 Säule (4 x 250 mm), der Firma CHROMPACK, A: 0,1 % TFA, B: 80 % Acetonitril in A, Gradient von 0-70 % B in (A + B) in 50 min, Durchflußrate 2 ml pro Minute.

Die Fraktionen wurden lyophilisiert und ansequenziert. Im vierten Gipfel wurde das gesuchte Peptid gefunden:

CE 3 AC 1: V-T-V-Y-V-X-V-P-X-G-P-

Die nicht bestimmten Aminosäuren X sind Cystein und Serin, die aber schon früher sequenziert worden waren. Somit war die Sequenz von Fragment d 1 mit einer Länge von 327 Aminosäuren vollständig bestimmt (Abb. 42).

					-3 -1
					EYR
1	10	20	30	40	50
DAVTVAHVVRKDLDTLTAGEIESLRSAFLDIQQDHTYENIASFHGKPGLC					
51	60	70	80	90	100
QHEGHKVVACSVSGMPTFPSSWHRLYVEQVEEALLDHGSSVAVPYFDWISPI					
101	110	120	130	140	150
QKLPLDISKATYYNSREQ					
					QRFDPNPFFSGKVAGEDAVTTTRDPQPELFNNNY
					<u>ATYYNSREQRFDPNPFF</u>
					-K 1-
151	160	170	180	190	200
FYEQALYALEQDNFDDFEIQFEVLHNAHLSWLGGHAKYSFSSLDYTA FDP					
201	210	220	230	240	250
VFFLHHANTDRLWAIWQELQRYRGLPYNEADCAINLMRKPLQPFQDKKLN					
251	260	270	280	290	300
PRNITNIYSRPADTFDYRNHFHYEYDTLELNHQTVPQLENLLKRRQEYGR					
301	310	320	330		
VFAGFLIHNNGLSADVTVYVCVPSGPK					
					<u>VTVVTVVPXGP</u>
					-CB 3 AC 1-

Abb. 42: Gesamtsequenz des Fragments d 1. Die Peptide, die zur Vervollständigung der Sequenz beitrugen, sind unterstrichen.

IV. Strukturaufklärung des Fragments d 2

Fragment d 2 läßt sich, wie schon zu Beginn erläutert, durch Gelfiltration isolieren. Damit bietet sich die Gelegenheit d 2 getrennt von Fragment d 1 zu sequenzieren. Bei d 2 handelt es sich um ein Peptid mit einem Molekulargewicht von etwa 10000 D, das entspricht etwa 90 Aminosäuren. Aus der Diplomarbeit von Frau SIGMUND waren einige Peptide bekannt, die sich nicht in Fragment d 1 einordnen ließen. Sie sind in der Abb. 43 dargestellt. Darunter sind drei aus der Bromcyanspaltung entstandene Peptide (G-K-N-D-, P-F-T-F- und X-X-I/L-I/L-), von denen eines schon als N-terminal von d 2 identifiziert werden konnte (G-K-N-D-). Die restlichen Peptide sind aus tryptischen Spaltungen entstanden.

1*	10*	20*	30*	40*	50*
6 K ₁ NDXNHK ₁ AGVFSVLGG		PFTFDR ₁ LYK ₁ LQI		QLGLK ₁ XNNAASY	
51*	60*	70*	80*		
QL	VEI	XXL ₁ LPDPSIIFEPGTK ₁ E			

Abb. 43: Sequenzen aus der Diplomarbeit von Frau SIGMUND, die sich nicht in Fragment d 1 einordnen ließen und dem Fragment d 2 zugeordnet wurden. Die Peptide sind zur besseren Übersicht in der Reihenfolge dargestellt, wie sie am Ende der Sequenzierung angeordnet wurden. Mit Pfeilen (†) sind mögliche Spaltstellen für Trypsin markiert.

1. Spaltung des Fragments d 2 mit Trypsin

Aus Abb. 43 wird ersichtlich, daß aus einer Spaltung von d 2 mit Trypsin Peptide entstehen könnten, die für eine weitere Aufklärung der Sequenz von Vorteil wären. Für die Spaltung wurden 2,1 mg des Fragments d 2 in 3 ml NH_4CO_3 Puffer gelöst, mit 2 % Trypsin versetzt und für 17 Stunden bei 37 °C inkubiert. Da nur eine relativ geringe Zahl an Peptiden erwartet wurde, konnte auf eine Gelfiltration als Vorreinigung verzichtet werden. Zur Auftrennung diente die HPLC im TFA-System. Dazu wurde das lyophilisierte Peptidgemisch in 50 %-iger Ameisensäure gelöst und in fünf Portionen getrennt (Abb. 44).

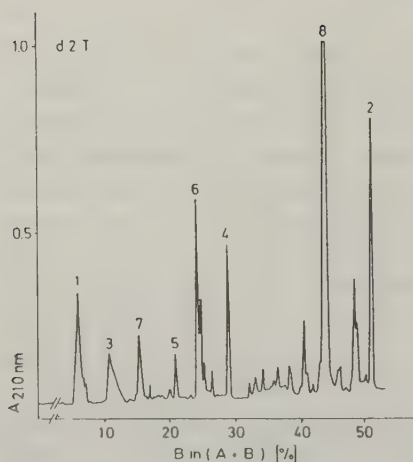


Abb. 44: Reversed-phase HPLC des Fragments d 2 nach der Spaltung mit Trypsin. Die Trennung erfolgte auf einer VYDAC TP/RP 10 Säule (4 x 250 mm) der Firma CHROMPACK, A: 0,1 % TFA, B: 80 % Acetonitril in A, Gradient von 0-70 % B in (A + B) in 50 min, Durchflußrate 2 ml pro Minute

Die Gipfel wurden lyophilisiert und ansequenziert. Die Aminosäuren der folgenden Peptide wurden bestimmt:

- T 1: G-K-N-D-C-N-H-
- T 2: A-G-V-F-S-V-L-G-G-E-L-E-M-P-F-T-F-D-R;
- T 3: L-Y-K;
- T 4: L-Q-I-T-D-T-I-
- T 5: Q-L-G-L-K;
- T 6: V-N-N-A-A-S-Y-Q-L-
- T 7: V-E-I-
- T 8: A-V-P-G-T-I/L-I/L-D-P-H-I/L-I/L-P-D-P

Durch die Sequenzierung von T 1 konnte die Position 5 von d 2 als Cystein bestimmt werden. T 1 enthält zwei Lysinreste (Tab. 6, S. 74), weil die Peptidbindung zwischen den Aminosäuren Lysin und Asparagin von Trypsin nicht gespalten wird. T 2 und T 3 verbanden und verlängerten CB 1 und CB 2. Von T 6 konnte das N-terminale Valin geklärt werden, das von Frau SIGMUND nicht bestimmt worden war. Neu war die Sequenz von T 8, das in das Fragment von Position 66 - 82, aus einer Kombination einer Nebensequenz eines

Bromcyanpeptids und eines tryptischen Peptids entstanden, hineinlief. T 3, T 4, T 5 und T 7 bestätigten die schon ermittelten Sequenzen. Die Aminosäureanalysen der verschiedenen Peptide (Tab. 6) bestätigen die Isoleucin/Leucin Positionen in T 5 und T 7, bei T 4, T 6 und T 7 konnte geschlossen werden, daß zur kompletten Sequenz jeweils nur noch das C-terminale Lysin fehlte. Nach der Spaltung des Fragments d 2 mit Trypsin waren 79 Aminosäuren dieses Peptids bekannt (Abb. 45). Ein Verdau mit Chymotrypsin sollte weitere Aufklärung der Gesamtsequenz bringen. Mögliche Spaltstellen nach Tyrosin und Phenylalanin sind mit Pfeilen (↑) gekennzeichnet.

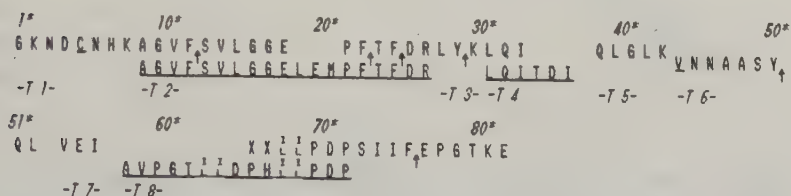


Abb. 45: Teilsequenz von Fragment d 2 nach der Spaltung mit Trypsin. Unterstrichen sind Peptide, die neue Sequenzinformationen lieferten.

2. Spaltung des Fragments d 2 mit Chymotrypsin

Für eine Spaltung mit Chymotrypsin wurden 4,2 mg des Fragments d 2 in 5 ml NH_4CO_3 Puffer gelöst, mit 2 % Protease versetzt und 5 Stunden inkubiert. Eine Auftrennung des Peptidgemisches erfolgte mit der HPLC im TFA-System. Das Lyophilisat wurde in 50 %-iger Ameisensäure gelöst und in 4 Portionen zu 100 μl aufgetragen. Es entstand das in Abb. 46 dargestellte, sehr komplexe Elutionsprofil. Die Gipfel wurden lyophilisiert und ansequenziert. Folgende, reine Peptide wurden identifiziert:

Ch 2: S-V-L-G-G-

Ch 3: T-F-D-R-

Ch 7: I/L-D-P-H-I/L-I/L-P-D-P-

Ch 8: E-P-G-T-K-E-R;

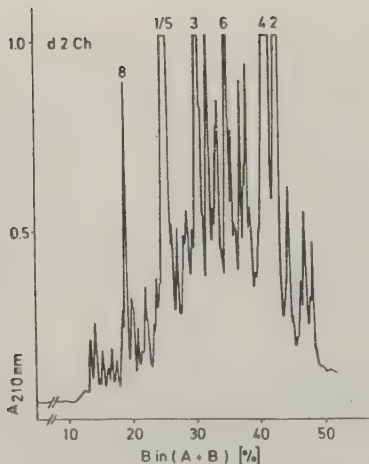


Abb. 46: Reversed-phase HPLC des Fragments d 2. nach der Spaltung mit Chymotrypsin. Die Trennung erfolgte auf einer VYDAC TP/RP 10 Säule (4 x 250 mm), der Firma CHROMPACK, A: 0,1 % TFA, B: 80 % Acetonitril in A, Gradient von 0-70 % B in (A + B) in 50 min, Durchflußrate 2 ml pro Minute.

Von diesen Peptiden brachte nur Ch 8, das in auffallend geringer Menge vorhanden war, neue Sequenzinformation. Es konnte das Bruchstück von Position 57 - 82 um eine Aminosäure (Arginin) verlängern. Da Chymotrypsin nicht nach Arginin spaltet, kann dieses Peptid als C-terminales von Fragment d 2 (und damit auch von Fragment d) angesehen werden. Ein C-terminales Arginin entspricht der Erwartung, da die funktionelle Einheit d mit Trypsin, das nach Lysin und Arginin spaltet, aus dem Gesamtmolekül gespalten wird.

Einige Fraktionen enthielten mehrere Peptide, so daß eine weitere Auftrennung durch HPLC im Acetatsystem nötig war. Für eine Nachreinigung wurden nur Fraktionen verwendet, die für die Fortführung der Sequenz interessante Peptide enthielten. Es waren dies Ch 4, Ch 5 und Ch 6. Die Fraktionen, die diese Peptide enthielten, wurden in 100 µl 50 %-iger Ameisensäure gelöst und auf die Säule aufgetragen (Abb. 47). Es wurden vier weitere Peptide sequenziert:

- Ch 1: G-K-N-D-C-N-H-K-A-G-V-
- Ch 4: K-L-Q-I-T-D-T-I-K-Q-L;
- Ch 5: G-L-K-V-N-N-A-A-S-
- Ch 6: Q-I/L-K-V-E-I/L-

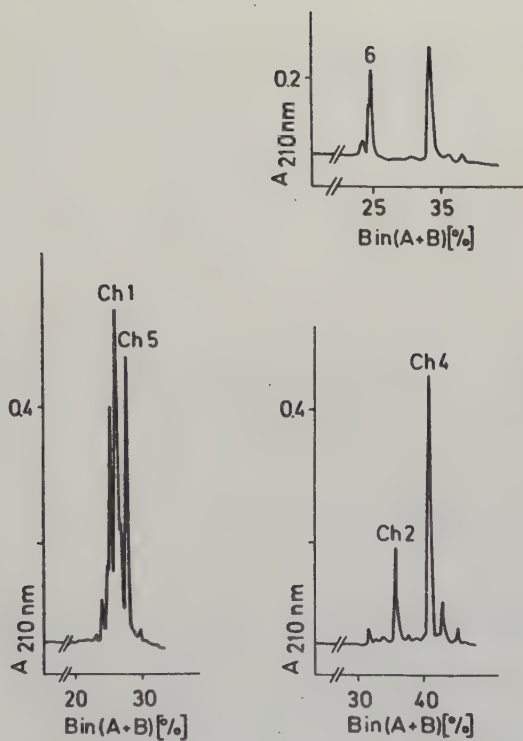


Abb. 47: Nachreinigung von Peptiden aus der Trennung im TFA-System nach der Spaltung von d 2 mit Chymotrypsin auf einer SERVA RP 18, 5 μ Säule (4,6 x 250 mm),
A: 0,05 M Ammoniumacetat, pH 6,0, B: 60 % Acetonitril in A, pH 6,0, Gradient 0-60 % B in (A + B) in 30 Minuten, Durchflußrate 2 ml pro Minute.

Ch 1 bestätigte den N-Terminus von d 2. Ch 4 wurde maschinell bis zum C-terminalen Leucin sequenziert und konnte damit T 4 und T 5 verbinden. Die Überlappung von T 5 nach T 6 kam durch die Sequenzierung von Ch 5 zustande, dessen Aminosäureanalyse das fehlende Tyrosin zeigt und die zweite Aminosäure als Leucin bestätigt (Tab. 6). Durch die Überlappung mit T 6 schließt Ch 6 an Ch 5 an. Die Isoleucin/Leucin Positionen von Ch 6 sind aus der Bestimmung von T 6 und T 7 eindeutig. Bei Betrachtung der Analyse von Ch 6 (Tab. 6) erkennt man, daß dieses Peptid nur um eine Aminosäure (Lysin) länger ist, als es sequenziert werden konnte, und damit wie T 7 endet. Dies ist überraschend, da Chymotrypsin nicht nach Lysin spaltet. Diese tryptische Spaltstelle resultiert möglicherweise, wie Ch 8, aus der limitierten Spaltung mit Trypsin des Gesamtmoleküls von E_c. Dieser Befund läßt den Schluß zu, daß es sich bei Fragment d 2 um ein Peptid mit heterogenem C-Terminus handelt.

Mit Hilfe der chymotryptischen Spaltung war es also gelungen, bis auf eine Lücke nach Position 57 die komplette Sequenz des Fragments d 2 zu bestimmen (Abb. 48). In der folgenden Spaltung mit der Protease aus *S. aureus* sollte das Peptid mit dem Beginn I-K- gesucht werden, da dieses als eine günstige Möglichkeit für eine Überlappung angesehen wurde. Die möglichen Spaltstellen sind mit einem Pfeil (†) markiert.

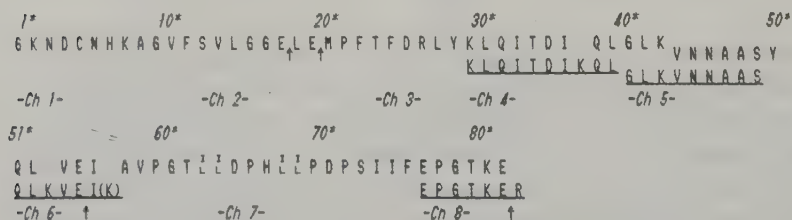


Abb. 48: Sequenz von Fragment d 2 nach der Spaltung mit Chymotrypsin. Peptide, die für Überlappungen verwendet werden konnten, sind unterstrichen. Mit Pfeilen (†) sind mögliche Spaltstellen der Protease aus *S. aureus* gekennzeichnet.

3. Spaltung des Fragments d 2 mit der Protease aus *Staphylococcus aureus*

Für die Spaltung mit der Protease aus *Staphylococcus aureus* wurden 5,2 mg eingesetzt. Die Auftrennung des Peptidgemisches erfolgte mit der HPLC im TFA-System. Das Lyophilisat wurde in 50 %-iger Ameisensäure gelöst und in 4 Portionen zu 100 µl getrennt. Es wurde das in Abb. 49 dargestellte Elutionsprofil mit nur wenigen, bei hoher Acetonitrilkonzentration eluierten Gipfeln gewonnen. Die Fraktionen wurden lyophilisiert und ansequenziert. Es wurden die beiden folgenden Peptide identifiziert:

SP 1: G-K-N-D-

SP 2a/2b: I/L-K-A-V-P-G-T-I/L-I/L-D-P-H-I/L-I/L-P-D-P-

SP 2 lieferte die gesuchte Überlappung von T 7 zu T 8. SP 2 trat in zwei verschiedenen Gipfeln auf, die sich wegen der unterschiedlichen Länge der enthaltenen Peptide getrennt hatten. Wie die Aminosäureanalysen (Tab. 6) zeigen, muß ein Peptid (SP 2a) schon nach dem Phenylalanin an Position 76

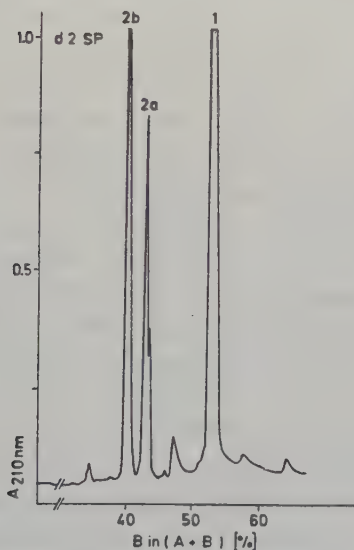


Abb. 49: Reversed-phase HPLC von Fragment d 2 nach Spaltung mit der Protease aus *Staphylococcus aureus* V 8. Die Trennung erfolgte auf einer VYDAC TP/RP 10 Säule (4 x 250 mm) der Firma CHROMPACK, A: 0,1 % TFA, B: 80 % Acetonitril in A, Gradient von 0-70 % B in (A + B) in 50 min, Durchflußrate 2 ml pro Minute.

enden (vgl. Abb. 50), da keine Glutaminsäure enthalten ist, während das andere Peptid (SP 2b) länger ist. Diese Beobachtung läßt wieder auf einen heterogenen C-Terminus von Fragment d 2 schließen. Allerdings muß dann bei der limitierten Proteolyse des β -Hämocyansins die Protease Trypsin mit chymotryptischer Nebenaktivität gespalten haben. Offensichtlich hatte die *S. aureus* Protease nach den Glutaminsäureresten an Position 18, 20 und 77 nicht gespalten, da der Gipfel SP 1 die für d 2 N-terminale Sequenz G-K-N-D- enthielt. Die nach der Spaltung mit *S. aureus* Protease vollständige Sequenz zeigt die Abb. 50.

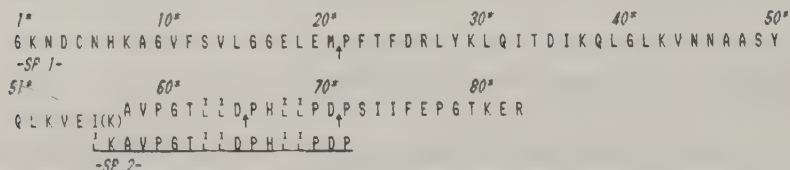


Abb. 50: Sequenz von Fragment d 2 nach der Spaltung mit der Protease aus *Staphylococcus aureus* V 8. Unterstrichen ist das Peptid, dessen Sequenz die letzte Lücke in d 2 schloß.

4. Spaltung von Fragment d 2 mit Bromcyan zur Klärung offener Positionen

Da bisher einige Isoleucin/Leucin Positionen in Fragment d 2 nicht eindeutig geklärt waren, sollte dies durch Isolierung und automatische Sequenzierung des Säurespaltstücks von Position 66 bis 83, das schon von Frau SIGMUND ansequenziert worden war, geschehen. Die vollständige Sequenzierung dieses Peptids könnte auch weitere Hinweise über den C-Terminus von Fragment d 2 liefern. Die Spaltstelle für Bromcyan (21*) und die beiden säurelabile Peptidbindungen (65* und 71*) sind in Abb. 50 mit Pfeilen (†) gekennzeichnet. 2,5 mg von Fragment d 2 wurden mit Bromcyan gespalten. Das lyophilisierte Reaktionsgemisch wurde in 2 ml 8 M Harnstoff gelöst und auf eine Biogel P-10 Säule aufgetragen. Das Elutionsprofil zeigt die Abb. 51. Es wurden sieben Fraktionen gebildet, die lyophilisiert und ansequenziert wurden. Die Fraktionen I und VII enthielten jeweils ein Peptid:

I: G-K-N-D-
VII (AC 2b): P-S-I-I-

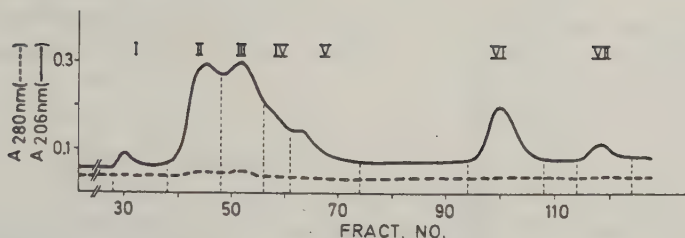


Abb. 51: Gelfiltration des Bromcyanspaltgemisches von d 2 auf einer Biogel P-10 Säule (1,5 x 120 cm), äquilibriert mit 0,4 %-iger TFA, Durchflußrate 4 ml pro Stunde, Fraktionsgröße 30 Minuten.

Bei dem Peptid aus Fraktion I handelt es sich um ungespaltenes Material, bei VII um das durch Säurespaltung entstandene C-terminale AC 2b. Die Fraktion VI wurde mit der HPLC im TFA-System in zwei Portionen zu 100 µl in 50 %-iger Ameisensäure gelöst in die zwei Peptide CB 1 und AC 2a getrennt (Abb. 52). CB 1 wurde von Hand 19 Schritte sequenziert, AC 2a konnte maschinell bis zum C-Terminus identifiziert werden:

CB 1: G-K-N-D-C-N-H-K-A-G-V-F-S-V-L-G-G-E-L-

AC 2a: P-H-I-L-P-D-P-S-I-I-F-E-P-G-T-K-E-R;

Die Sequenz von CB 1 bestätigte den N-Terminus des Fragments d 2, während AC 2a durch die automatische Sequenzierung die noch ungeklärten Positionen bestimmen konnte. Ein Blick in die Aminosäureanalyse von T 8 läßt die restlichen zwei Isoleucin/Leucin Positionen (63*, 64*) durch Subtraktion des bekannten Leucin und der drei bekannten Isoleucine als Leucine erkennen. AC 2a endet, wie schon das Peptid Ch 8, für die Spaltmethode unspezifisch, so daß geschlossen werden konnte, daß dies der C-Terminus von Fragment d 2 ist.

Die Fraktionen II, III, IV und V enthielten jeweils ein Gemisch von CB 2 (P-F-T-F-) und dem nur teilweise, da größer als CB 1, gespalten N-terminalen Bruchstück (G-K-N-D-). Die Heterogenität von CB 2 erklärt sich aus den mit verschiedener Ausbeute abgespaltenen Peptiden AC 2a und AC 2b und aus dem heterogenen C-Terminus von Fragment d 2. Da in Fraktion III neben den bei-

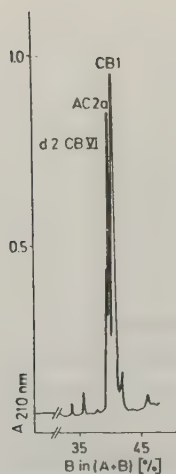
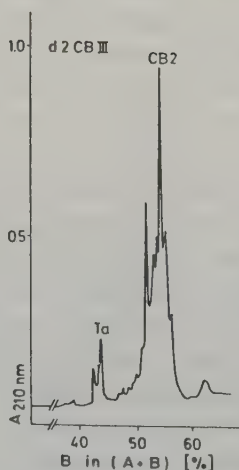


Abb. 52: Reversed-phase HPLC der Fraktion CB VI aus der Spaltung von Fragment d 2 mit Bromcyan. Die Trennung erfolgte auf einer VYDAC TP/RP 10 Säule (4 x 250 mm) der Firma CHROMPACK. A: 0,1 % TFA, B: 80 % Acetonitril in A, Gradient von 0-80 % B in (A + B) in 50 min, Durchflußrate 2 ml pro Minute.

Abb. 53: Reversed-phase HPLC der Fraktion CB III aus der Spaltung von Fragment d 2 mit Bromcyan. Die Trennung erfolgte auf einer VYDAC TP/RP 10 Säule (4 x 250 mm) der Firma CHROMPACK. A: 0,1 % TFA, B: 80 % Acetonitril in A, Gradient von 0-80 % B in (A + B) in 50 min, Durchflußrate 2 ml pro Minute.



den besprochenen Peptiden noch ein weiteres Peptid enthalten war, wurde sie mit Hilfe der HPLC im TFA-System aufgetrennt (Abb. 53). Von Bedeutung war ein relativ kleiner Gipfel, der ein Peptid mit der folgenden Sequenz enthielt:

Ta: V-E-I/L-K-A-V-P-G-T-I/L-I/L-D-P-

Dieses für eine Bromcyanspaltung ungewöhnliche Peptid, offensichtlich aus der Spaltung von B. mit Trypsin entstanden, konnte die Überlappung T 7 und SP 2 bestätigen. Mit den Peptiden aus der Bromcyanspaltung war nun die Sequenz von Fragment d 2 vollständig aufgeklärt (Abb. 54).

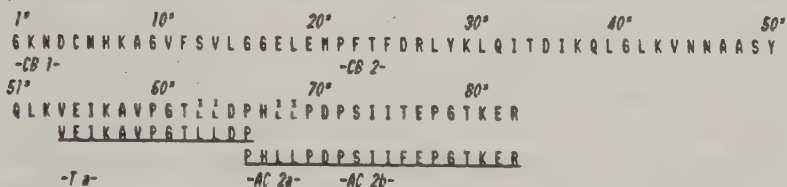


Abb. 54: Gesamtsequenz von Fragment d 2

5. Bestimmung des C-Terminus von d 2

Die Bestimmung des C-Terminus von d 2 ließ nur die Aminosäure Arginin erkennen (Abb. 55). Es handelt sich hierbei offensichtlich um den Argininrest von Position 83°. Weitere Aminosäuren konnten nicht festgestellt werden.

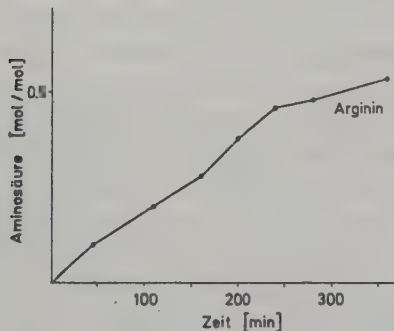


Abb. 55.: Freisetzung von Aminosäuren nach Inkubation von d 2 mit Carboxypeptidase Y. Es wurde nur die Aminosäure Arginin festgestellt.

	T 1	T 2	T 3	T 4	T 5	T 6	T 7	T 8	Ch 1	Ch 2
C	0,5 (1)								0,6 (1)	
D	3,2 (1)	1,1 (1)		1,2 (1)		2,1 (0)		2,2 (2)	3,2 (1)	
N	(2)					(2)			(2)	
T		0,6 (1)		1,7 (2)				2,3 (2)		
S		1,1 (1)				1,3 (1)		0,7 (1)		1,2 (1)
E		2,1 (2)		1,1 (0)	1,2 (0)	1,1 (0)	1,2 (1)	1,1 (1)		1,9 (2)
Q				(1)	(1)	(1)				
P		0,8 (1)						4,3 (5)		0,8 (1)
G	1,4 (1)	3,5 (3)			1,8 (1)			3,4 (2)	2,4 (2)	2,5 (2)
A		0,9 (1)				1,8 (2)		0,9 (1)	0,9 (1)	
V		1,8 (2)				0,9 (1)	0,9 (1)	0,8 (1)	1,0 (1)	1,0 (1)
M		0,6 (1)								0,2 (1)
I				2,2 (2)			1,1 (1)	3,2 (3)		
L		2,2 (2)	0,9 (1)	1,2 (1)	2,3 (2)	1,1 (1)		3,0 (3)		2,2 (2)
Y			0,7 (1)			0,5 (1)				
F		1,6 (2)						0,6 (1)	0,7 (1)	0,5 (1)
K	2,0 (2)		1,0 (1)	1,0 (1)	1,0 (1)	1,0 (1)	1,0 (1)	1,0 (1)	2,0 (2)	
H	1,1 (1)							0,9 (1)	0,9 (1)	
R		1,0 (1)								
W										
I	(8)	(18)	(3)	(8)	(5)	(10)	(4)	(23)	(12)	(11)

	Ch 3	Ch 4	Ch 5	Ch 6	Ch 8	SP 2a	SP 2b
C							
D	1,2 (1)	1,2 (1)	2,1 (0)			2,2 (2)	2,1 (2)
N			(2)				
T	1,0 (1)	1,7 (2)			0,8 (1)	0,9 (1)	1,8 (2)
S			1,2 (1)			1,3 (1)	1,2 (1)
E		2,0 (0)		2,3 (1)	2,1 (2)		2,1 (2)
Q		(2)		(1)			
P					0,8 (1)	3,7 (4)	4,6 (5)
G			1,5 (1)		1,5 (1)	2,4 (1)	2,7 (2)
A			2,2 (2)			0,9 (1)	0,9 (1)
V			1,0 (1)	1,1 (1)		1,0 (1)	1,0 (1)
M							
I		2,1 (2)		1,0 (1)		2,9 (3)	2,9 (3)
L	1,1 (1)	2,3 (2)	1,1 (1)	1,2 (1)		4,2 (4)	4,1 (4)
Y	0,9 (1)		0,7 (1)				
F	0,9 (1)					0,9 (1)	0,8 (1)
K		2,2 (2)	1,3 (1)	2,2 (2)	1,2 (1)	1,2 (1)	2,2 (2)
H						1,0 (1)	1,0 (1)
R	1,0 (1)				1,0 (1)		
W							
I	(6)	(11)	(10)	(7)	(7)	(21)	(27)

Tab. 6: Aminosäurezusammensetzung von Peptiden aus Spaltungen des Fragments d 2.

V. Die Verknüpfung der Fragmente d 1 und d 2

1. Versuch zur Isolierung eines überlappenden Peptids

Im Laufe der Sequenzierung der Fragmente d 1 und d 2 waren eine Reihe von Trennungen über die Sephacryl S-200 sf Säule durchgeführt worden, bei denen jeweils etwas Material des Fragments d in geringer Menge anfiel. Die Fragment d enthaltenden Fraktionen wurden entsalzt und lyophilisiert, bis sich etwa 20 mg, die für eine Weiterverarbeitung ausreichen, angesammelt hatten. Eine Spaltung mit Bromcyan erschien günstig, da hiermit das Peptid CB 3, mit einem verlängertem C-Terminus (plus CB 1 aus Fragment d 2), isoliert werden könnte. Eine Nachspaltung sollte dann ein Peptid liefern, das zumindest über den C-Terminus des Fragments d 1 hinausläuft, wenn nicht sogar Fragment d 1 und d 2 verbindet. Aus den Molekulargewichten, im SDS-Gel ermittelt, mußte geschlossen werden, daß ein Peptid zwischen d 1 und d 2 fehlt, da, übereinstimmend mit *GIELENS et al. (1980)* für d 56000 D, für d 1 43000 D und für d 2 etwa 10000 D bestimmt wurden (bei *GIELENS et al., 1980*: d 2 < 15000). Durch die Sequenzierung von d 1 und d 2 hatte sich gezeigt, daß die Molekulargewichte im SDS-Gel überschätzt worden waren. Fragment d 1 hat mit 327 Aminosäuren und einem Kohlenhydratanteil von 3281 D (*WOOD et al., 1985*) ein Molekulargewicht von unter 41000 D, Fragment d 2 mit 83 Aminosäuren eines von 9500 D. Somit bestand die Möglichkeit, daß die Lücke kleiner ist, als die Differenz von 3000 D (20 bis 30 Aminosäuren) andeutet.

Für die Bromcyanspaltung wurden 20 mg von Fragment d eingesetzt. Die Auftrennung über eine Sephacryl S-200 sf Säule führte zu dem in Abb. 56 dargestellten Elutionsprofil. Die im Vergleich zu den Bromcyanpeptiden von Fragment d 1 unbefriedigende Trennung wurde in neun Bereiche eingeteilt. Die Fraktionen wurden entsalzt und ansequenziert. In Fraktion VI wurde die Sequenz R-K-P- identifiziert, weshalb dieser Bereich mit der HPLC im TFA-System aufgetrennt wurde. Das Schreiberbild zeigt Abb. 57; im markierten Gipfel (CB VI 1) ließ sich das gesuchte Peptid identifizieren.

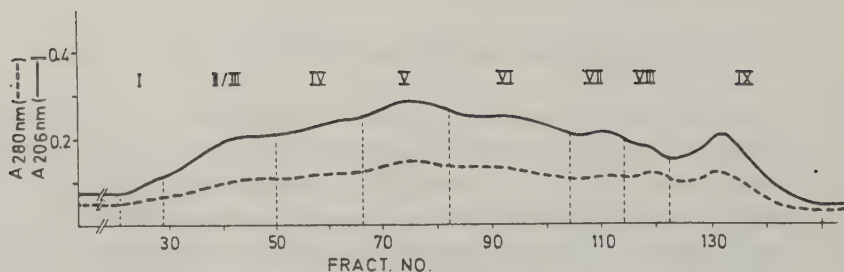


Abb. 56: Gelfiltration der Peptide des Fragments d nach Spaltung mit Bromcyan auf einer Sephacryl S-200 sf Säule (1,5 x 160 cm) äquilibriert mit 8 M Harnstoff/HCl Puffer, pH 3,5. Durchflußrate 4 ml pro Stunde, Fraktionsgröße 30 Minuten.

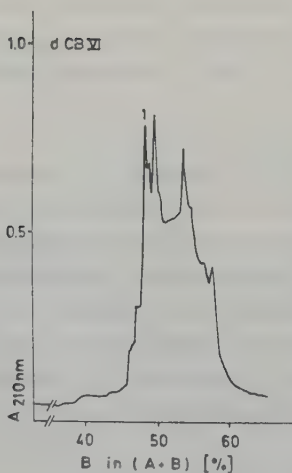


Abb. 57: Reversed-phase HPLC der Fraktion VI aus der Spaltung von Fragment d mit Bromcyan. Die Trennung erfolgte auf einer VYDAC TP/RP 10 Säule (4 x 250 mm), der Firma CHROMPACK, A: 0,1 % TFA, B: 80 % Acetonitril in A, Gradient von 0-70 % B in (A + B) in 40 min, Durchflußrate 2 ml pro Minute.

Der nächste Schritt war eine Nachspaltung mit Chymotrypsin. CB VI 1 wurde in 3 ml NH_4CO_3 Puffer gelöst und mit 20 μg Protease versetzt. Nach einer Inkubation von einer Stunde bei 37 °C wurde durch Zugabe von Eisessig die Reaktion gestoppt und anschließend das Gemisch lyophilisiert. Das Peptidgemisch wurde in 50 %-iger Ameisensäure gelöst und mit der HPLC im TFA-System getrennt (Abb. 58). Trotz der geringen Menge wurden alle zu erwartenden Peptide identifiziert. Von besonderem Interesse waren die beiden Peptide mit dem Beginn V-X-V-P- (1) und S-V-L-G- (2). Das eine ist das letzte chymotryptische Peptid vor der Lücke (ab Pos. 320 in d 1), das zweite das erste nach der Lücke (ab Pos. 13' in d 2). Da kein bisher unbekanntes Peptid sequenziert werden konnte, wurde geschlossen, daß Chymotrypsin im Bereich der Lücke, deren Länge nicht bekannt war, nicht gespalten hatte. Mit der manuellen Methode konnten nur sieben Schritte von 1 sequenziert werden, wobei die zweite und fünfte Aminosäure (Cystein und Serin) nicht identifiziert werden konnten, so daß mit einem zweiten Aliquot eine automatische Sequenzierung versucht wurde. Leider konnten auch nur sieben Schritte identifiziert werden, da die Maschine nach dem siebten Schritt einen Defekt hatte. Aus Materialgründen konnte der vorhergehende Versuch nicht wiederholt werden, da die Menge von 20 mg Fragment d im Laufe von mehr als zwei Jahren gesammelt worden war und in kürzerer Zeit eine für Spaltungen ausreichende Menge nicht zur Verfügung stehen würde. Deshalb mußte eine andere Strategie gewählt werden.

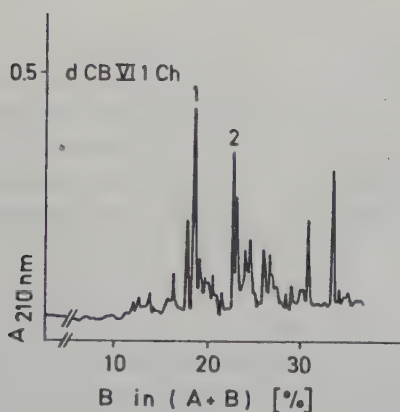


Abb. 58: Reversed-phase HPLC der Fraktion CB VI 1 nach Spaltung mit Chymotrypsin. Die Trennung erfolgte auf einer VYDAC TP/RP 10 Säule (4 x 250 mm), der Firma CHROMPACK, A: 0,1 % TFA, B: 80 % Acetonitril in A, Gradient von 0-70 % B in (A + B) in 50 min, Durchflußrate 2 ml pro Minute.

2. Spaltung von Fragment P 2 mit Bromcyan und Chymotrypsin

Ausgangspunkt für die folgenden Versuche waren die Überlegungen, Material zur Verfügung zu haben, aus dem sicher und in ausreichender Menge das wahrscheinlich überlappende chymotryptische Peptid herausgespalten werden könnte. Dazu bot sich *Helix pomatia* Hämocyanin β . P 2 an (GIELENS et al., 1980), das nach Spaltung der gesamten Untereinheit des β . Hämocyanins mit Plasmin aus einer Polypeptidkette besteht, die neben der funktionellen Einheit *d* noch *e*, *f* und *g* enthält, also ein Molekülmasse von über 200000 D besitzt (Abb. 2, S. 4). Aus dem Peptidgemisch einer Bromcyanspaltung dieses Proteins das gesuchte CB 3 der Einheit *d* zu isolieren, stellt ein schwer lösbares Problem dar.

Auf einen Vorschlag von Herrn Josef KELLERMANN wurde eine ungewöhnliche Lösung des Problems angestrebt. Der wichtigste Punkt in den Überlegungen war die Sequenz des gesuchten Peptids mit zwei Prolinresten im Abstand von drei Aminosäuren:



Bei einer Sequenzierung von Peptiden, die mit anderen Peptiden verunreinigt sind, besteht die Möglichkeit, bei bekannten Prolinresten eine Reaktion mit OPA durchzuführen, um alle in diesem Schritt nicht Prolin-haltigen Peptide zu blockieren. Das gesuchte Peptid kann dann ohne Einfluß der Verunreinigungen weitersequenziert werden.

Dieses Prinzip sollte auf das Peptidgemisch aus der Spaltung von P 2 mit Bromcyan und Chymotrypsin angewendet werden. Die sehr große Zahl von Peptiden sollte ohne Trennung gemeinsam sequenziert werden. Da ein Peptid mit Prolin an vierter und siebter Position - selbst in einer großen Zahl von Peptiden - nur mit begrenzter Wahrscheinlichkeit auftritt, bestand dann die Möglichkeit, daß nach zwei Blockierungen nur noch die Sequenz des gesuchten Peptids erhalten bleibt.

Zur Durchführung dieses Versuchs wurden 20 nmol von P 2 carboxymethyliert und über eine TSK G 2000 SW Säule entsalzt. Das lyophilisierte Protein wurde in 2 ml 70 %-iger Ameisensäure gelöst und mit Bromcyan versetzt. Bei der Mengenberechnung des zugegebenen Bromcyans wurde der Methioningehalt von *d*

auch für die drei weiteren funktionellen Einheiten angenommen. Die Lösung inkubierte unter Stickstoffatmosphäre bei Raumtemperatur für 24 Stunden im Dunkeln. Anschließend wurden 10 ml Wasser zugegeben und die Reaktion durch Lyophilisieren gestoppt. Der zweite Schritt war die Spaltung mit Chymotrypsin. Das Bromcyanspaltgemisch wurde in 5 ml NH_4CO_3 Puffer gelöst und mit 2 % Protease versetzt. Nach einer Stunde Inkubation bei 37 °C wurde durch Zugabe von Eisessig die Reaktion gestoppt und lyophilisiert. Zur Entfernung von möglichen Salzurückständen wurde das Peptidgemisch auf die TSK G 2000 SW Säule gegeben. Das lyophilisierte Gemisch aus wahrscheinlich mehreren hundert verschiedenen Peptiden sollte für eine automatische Sequenzierung verwendet werden.

Für den Sequenator wurden ein Viertel des gespaltenen Peptidgemisches, etwa 5 nmol, eingesetzt. Die Blockierung wurde wie in "Material und Methoden" beschrieben durchgeführt und die einzelnen Schritte identifiziert. Erwartungsgemäß waren in den ersten drei Schritten sämtliche Aminosäuren zu identifizieren. Durch die Blockierung zeigte der vierte Schritt nur Prolin. Bei den Schritten fünf und sechs war die Zahl der Aminosäuren schon begrenzt: beim fünften Schritt wurde unter anderen die Aminosäuren Serin, beim sechsten Glycin gefunden. Die Blockierung beim siebten Abbauschritt ließ wieder nur Prolin identifizieren. Ab diesem Schritt ließ sich jedoch eine von Verunreinigungen befreite Peptid bestimmen, dessen Sequenz folgendermaßen lautete:

P 2 CB Ch: X-X-X-P-X-X-P-K-G-K-N-D-X-N-H-
 -----d 1-----d 2-----

Dies war das überlappende Peptid von d 1 nach d 2, das die Gesamtsequenz der funktionellen Einheit d aus dem β -Hämocyanin der Weinbergschnecke *Helix pomatia* vervollständigte. Wie schon aus der vorherigen Aufarbeitung vermutet, fehlte zwischen den Fragmenten d 1 und d 2 kein Peptid. Die gesamte Sequenz der funktionellen Einheit d ist in Abb. 59 dargestellt.

-3
E Y R
-SP 0
???

1 D A V T V A S H V R K D L D T L T A G E I E S L R S A F L D I Q Q D H T Y E N I A S F H G K P G L C 50

---d,d 1---bis Position 410, 327---
---CB 1---
---T 1---T 2a/T 2---T 3---
---SP 0---
---SP 1---SP 3---SP 4---
---T 3 Ch---
???

51 Q H E G H K V A C S V S G M P T F P S W H R L Y E Q V E E A L L D H G S S V A V P Y F D W I S P I 100

---CB 2---bis Position 237---
---T 4---T 5---
---SP 5/6---CB 2 SP 2/SP 7---
---CB 2 SP 1---SP 7 Ch 2---
---CB 2 SP 3/SP 8---CB 2 SP 4---
---SP 7a---
---SP 7 Ch---
---Ch 1---
---K 1---
???

151 F Y E Q A L Y A L E Q D N F D D F E I Q F E V L H N A L H S W L G G H A K Y S F S S L D Y T A F D P 200

---T 12/T 12a---
---CB 2 SP 5---CB 2 SP 6/SP 13---
---T 13/T 13a---T 14---T 15---T 16---T 17a---
---CB 2 SP 7/SP 14---SP 15---
---Ch 2---
???

251 C H O P R N I T N I Y S R P A D T F D Y R N H F H Y E Y D T L E L N H Q T V P Q L E N L L K R R Q E Y G R 300

---CB 3---
---T 18---T 19---T 20/T 20a---T 21/T 21a---
---SP 17---SP 18---SP 19---
---Ch 3---Ch 4---Ch 5---
???

DISKUSSION

1. Sequenzierungsstrategie

Bei der Sequenzierung von einigen Arthropodenhäemocyaninen wurden die nativen Untereinheiten zunächst durch limitierte Proteolyse in große Bruchstücke zerlegt, um geeignete Ausgangsprodukte für weitere Spaltungen zu erhalten (SCHNEIDER et al., 1980; SCHARTAU et al., 1981; VEREIJKEN et al., 1982). Die funktionelle Einheit d des *Helix pomatia* β -Häemocyanins wird durch limitierte Trypsinolyse aus der Gesamteinheit gespalten; dabei entstehen drei Polypeptidketten: ein geringer Anteil ungespaltene Einheit (d), ein N-terminales Fragment mit einem Molekulargewicht von 43 kD im SDS-Gel (d 1) und ein C-terminales Fragment von etwa 10 kD (d 2). Die beiden Bruchstücke d 1 und d 2 sind geeignete Ausgangsprodukte für weitere Spaltungen. Für die vollständige Sequenzierung der funktionellen Einheit wird jedoch intakte d benötigt, da zwischen d 1 und d 2 eine Lücke von unbekannter Größe bestehen könnte.

Die Spaltung von d 1 mit Bromcyan führte zwar zu drei "echten" Bromcyan-peptiden, da aber die Spaltbedingungen in 70 %-iger Ameisensäure zur Bildung weiterer Peptide beitrugen und eine Reihe von nicht vollständig gespaltenen Bruchstücken entstand, waren die Elutionsprofile unübersichtlicher als erwartet und die Ausbeute an für Nachspaltungen verwendbaren Peptiden begrenzt. Trotzdem konnte durch die Arbeit von Frau SIGMUND CB 1 fast vollständig sequenziert werden. In der vorliegenden Arbeit wurde CB 2 mit der Protease aus *S. aureus* nachgespalten, CB 3 konnte 30 Schritte ansequenziert werden und diente der Klärung des C-Terminus von Fragment d 1. Viele Peptide aus den Spaltungen mit Trypsin und der Protease aus *S. aureus* konnten jedoch mit viel größerer Ausbeute bei gleichem Materialeinsatz wie bei der Bromcyanspaltung isoliert werden, so daß diese Spaltungen vorgezogen wurden.

Durch leistungsfähige Trennmethode konnten die komplexen Peptidgemische der Spaltungen mit Trypsin und der Protease aus *S. aureus* aufgetrennt und die Peptide rein dargestellt werden. Als Vortrennung bewährte sich die Gel-filtration über Sephacryl S-200, als anschließende Trennmethode die reversed-phase HPLC mit zwei verschiedenen Systemen, eines mit stark saurem, das andere mit leicht saurem Laufmittel.

Die Spaltungen von Fragment d 1 mit Bromcyan, Trypsin und der Protease aus *S. aureus* führten zu vielen überlappenden Peptiden. Nur vier Lücken mußten mit Peptiden, die durch andere Spaltmethoden gebildet wurden, geschlossen werden: Wenig erfolgreich war eine Spaltung mit 70 %-iger Ameisensäure, die säurelabile Peptidbindungen angreift. Die Peptide ließen sich nicht in der erforderlichen Menge isolieren. Erfolgreicher war die Spaltung mit Chymotrypsin. Eine große Anzahl von Peptiden - entstanden aus unvollständiger Spaltung - mußte getrennt und sequenziert werden. Da zum Abschluß der Arbeit für die restlichen Überlappungen nur noch wenige Peptide gesucht wurden, konnten diese ausgewählt und nachgereinigt werden. Für eine Überlappung (Pos. 268/269) war die unvollständige chymotryptische Spaltung nach Tyrosin (Pos. 267) von Vorteil (Ch 3, Ch 4).

Die restlichen beiden Überlappungen konnten durch die Anwendung der Endoproteinase Lys-C aus *Lysobacter enzymogenes*, die spezifisch C-terminal von Lysin spaltet, und die Nachspaltung von CB 3 mit verdünnter Salzsäure geschlossen werden. Diese spaltete vorzugsweise C-terminal von Asparaginsäure; die Ausbeute war jedoch gering.

Die Sequenzierung des Fragments d 2 ließ sich durch Anwendung von vier verschiedenen Spaltmethoden durchführen. Von großer Bedeutung waren die Spaltungen mit Trypsin und Chymotrypsin sowie Bromcyan für überlappende Peptide. Für die Protease aus *S. aureus* war nur eine Glutaminsäure zugänglich, so daß nur zwei Peptide entstanden.

Für die Schließung der Lücke zwischen d 1 und d 2 war die Blockierung mit α -Phthaldialdehyd von entscheidender Bedeutung. Selbst aus dem ungetrennten Gemisch der Peptide der Bromcyan- und chymotryptischen Spaltung von P 2, einem Polypeptid aus vier funktionellen Einheiten mit einem Molekulargewicht von über 200000 D, ließ sich nach zweimaliger Blockierung aller Aminosäuren vor den Abbauschritten, bei denen die Iminosäure Prolin erwartet wurde, eine eindeutige Sequenz identifizieren.

Die Peptide wurden mit einer Kombination von manuellem Abbau (CHANG et al., 1978) und automatischem Abbau (EDMAN & HENSCHEN, 1975) sequenziert. Alle Peptidfraktionen wurden zunächst mit der manuellen Methode ansequenziert, um ihre Einheitlichkeit zu prüfen. Waren mehrere Peptide in der Fraktion, wurde nachgereinigt. Enthielt die Fraktion nur ein Peptid, wurden, wenn das Peptid unbekannt war, so viele Schritte, wie möglich waren, identifiziert. Da mit der Methode nach CHANG et al. (1978) maximal etwa 25 Schritte, häufig

aber auch weniger, identifizierbar sind, wurde für längere Peptide die automatische Sequenzierung angewendet. Mit ihr wurden bis zu 35 Reste bestimmt. Da sich mit der manuellen Abbaumethode die Aminosäuren Leucin und Isoleucin nicht getrennt identifizieren lassen, wurde zur eindeutigen Bestimmung dieser Aminosäuren die Aminosäureanalyse verwendet. Diese ist bei Peptiden, die nur eine dieser Aminosäuren enthalten, hinreichend. Bei Peptiden, die Leucin und Isoleucin nebeneinander enthielten, wurde durch Vergleich mit den Daten anderer, überlappender Peptide und Subtraktion der bekannten Positionen versucht, die Aminosäuren zuzuordnen. Eine weitere Möglichkeit war, diese Peptide automatisch zu sequenzieren, da dann die Identifizierung der Leucin- und Isoleucinderivate über die HPLC keine Probleme bereitet. So blieb in der Gesamtsequenz keine Position, an der die Zuordnung zweideutig war.

2. Charakteristiken der Gesamtsequenz

Mit der Gesamtsequenz kann auch die Frage des Molekulargewichts der funktionellen Einheit *d* gelöst werden. Insgesamt wurden 413 Aminosäuren bestimmt. Hier sind die drei Aminosäuren, die aus einem Peptid, das nur in geringer Ausbeute isoliert werden konnte (SP 0) und den N-Terminus verlängerte, eingerechnet. Mit diesen 413 Aminosäuren erhält man ein Molekulargewicht von 47418 D. Dazugezählt werden muß noch der Anteil der Kohlenhydratseitenkette, der von WOOD *et al.* (1985) zu 3281 D berechnet wurde. Der Wert 3281 D folgt aus der Bestimmung des Gehalts (mol/mol Protein) verschiedener Zucker und dessen Rundung auf ganzzahlige Werte. Es ergibt sich ein Gesamtmolekulargewicht des Proteins von 50681 D. Das sind etwa 8 % weniger als in der sorgfältigen Molekulargewichtsbestimmung mit Hilfe der Polyacrylamidgel-Elektrophorese von WOOD *et al.* (1985) (55000 D) und etwa 4 % weniger als in der Molekulargewichtsbestimmung aus Sedimentationsgleichgewichtsanalysen (52400 D) mit der analytischen Ultrazentrifuge in derselben Arbeit. Nachdem die Größe von Untereinheiten des Arthropodenhäemocyanins durch Ermittlung der Aminosäuresequenz direkt bestimmt wurde und sich Molekulargewichte von etwa 75000 D bestätigten (SCHNEIDER *et al.*, 1983, SCHARTAU *et al.*, 1983), kann nun mit der durchgehenden Sequenz der funktionellen Einheit *d* die Diskussion um einen Aufbau von Molluskenhäemocyanin aus Peptiden mit einem Molekulargewicht von 25000 D (DIJK *et al.*, 1970; GHIRETTI MAGALDI *et al.*, 1975) beendet werden. Die funktionelle Einheit eines Molluskenhäemocy-

nins hat ein Molekulargewicht von etwa 50000 D und besteht aus einer Polypeptidkette.

Die limitierte Spaltung des β -Hämocyanins mit Trypsin erfolgt nur an relativ wenigen Stellen, die Konformation des Proteins bleibt erhalten, da nur an der Oberfläche des Moleküls liegende Peptidbindungen angegriffen werden. Die Funktion der Sauerstoffbindung bleibt trotz der Spaltung von kovalenten Bindungen erhalten. Wie GIELENS et al. (1980) gezeigt haben, lassen sich einzelne funktionelle Einheiten vollständig intakt isolieren, nur die Einheit d besitzt eine interne Spaltstelle. Die beiden Peptide (d 1 und d 2) werden jedoch durch eine Cystinbrücke verbunden und können erst nach Reduktion getrennt werden.

Bei der Sequenzierung von d konnten einige weitere Peptidbindungen entdeckt werden, die mit geringer Ausbeute gespalten werden. Der N-Terminus von d wurde durch ein Peptid (SP 0) verlängert, das nach der Spaltung mit der Protease aus *S. aureus* isoliert werden konnte. Dieses Peptid ragt um drei Aminosäuren über den sonst beobachteten N-Terminus der Gesamtkette hinaus. Damit konnte auch die Peptidbindung, die in der Regel gespalten wird, als zwischen den Resten Arginin und Asparaginsäure liegend identifiziert werden. Der C-Terminus von d 2 und damit auch von d erwies sich ebenfalls als heterogen, es konnten mehrere Peptide bestimmt werden, die mit Aminosäuren endeten, die für die verwendete Spaltmethode untypisch waren (Lysin Pos. 380, Phenylalanin Pos. 403 und Arginin Pos. 410). Besonders die Peptidbindung zwischen den Positionen 380/381 ist durch die limitierte Spaltung betroffen, da ein chymotryptisches Peptid mit guter Ausbeute isoliert wurde, das mit Lysin (380) endete. Beim Abbau von d 2 mit der Carboxypeptidase konnte keine Heterogenität des C-Terminus festgestellt werden; es wurde nur die Aminosäure Arginin bestimmt. Die anderen möglichen C-Termini treten in so geringer Ausbeute auf, daß sie mit dieser Methode nicht bestimmt werden konnten.

Ein ungewöhnliches Peptid aus der Trennung der Bromcyanpeptide war T a, das an Position 381 beginnt (V-E-I-K-A-V-P-G-T-) und aus einer Spaltung der Peptidbindung zwischen Lysin und Valin (380/381) entsteht. Möglicherweise wurde die Bindung in diesem Fall schon während der limitierten Spaltung mit Trypsin gespalten und das entstandene Peptid über die verschiedenen Trennungen mitgeschleppt. Leider war die Menge so gering, daß keine Aminosäureanalyse angefertigt werden konnte, die die Länge des Peptids ab-

schätzen ließ. Aus einem Vergleich mit den Peptiden aus d 2 CB III läßt sich aber schließen, daß T a über den C-Terminus von d 2 hinausreicht, da die Peptide aus CB III eine Länge von etwa 60 Aminosäuren besitzen. Eine weitere Beobachtung, die auf einen heterogenen C-Terminus schließen ließ, war das Auftreten von zwei unterschiedlich langen Peptiden aus der Spaltung mit *S. aureus* (SP 2a und SP 2b). Wie die Aminosäureanalyse zeigt, endet SP 2a mit dem Phenylalanin von Position 403, während SP 2b mit der Glutaminsäure von Position 409 endet. Die Peptidbindung 404/405 Glutaminsäure/Prolin wurde, wie schon von *HOUMARD & DRAFEAU (1972)* beschrieben, nicht angegriffen. Wahrscheinlich wurde die Bindung 403/404 während der nativen Spaltung von Trypsin angegriffen, das geringe chymotryptische Nebenaktivität besaß. Die Spaltung der funktionellen Einheit d in zwei Peptide, die sich nach Reduktion trennen, läßt Schlüsse auf die Cystinbrücken zu. Insgesamt wurden fünf Cysteinreste festgestellt, in d 1 an den Positionen 50, 59, 231 und 321, in d 2 nur an Position 332. Damit muß Cystein 332 im nichtreduzierten Molekül mit einem der Cysteine von d 1 zum Cystin gebunden vorliegen.

Eine bedeutende Eigenschaft der funktionellen Einheit d ist ihr Zuckergehalt. Er wurde von *WOOD et al. (1985)* auf 20 Zuckermoleküle pro Molekül d bestimmt (Werte auf ganze Zahlen gerundet). Die verschiedenen Zuckerreste besitzen zusammen ein Molekulargewicht von 3281 D. Die Sequenzierung der funktionellen Einheit d bot nun die Gelegenheit, die Zuckerbindungsstellen zu ermitteln. Generell werden Zucker N-glykosidisch an Asparaginreste gebunden, wobei die übernächste Aminosäure C-terminal vom Asparagin ein Threonin oder Serin ist, oder O-glykosidisch an die Aminosäuren Threonin oder Serin. Bei der Sequenzierung werden Zuckerbindungsstellen durch Lücken bei der Identifizierung entdeckt, da sich das Aminosäurederivat mit der Kohlenhydratkette wegen seiner Hydrophilizität nicht durch Extraktion vom Rest des Proteins trennen läßt.

Bei der Sequenzierung der Peptide der funktionellen Einheit d fiel nur eine Stelle auf, an der keine Aminosäure bestimmt werden konnte. Es war Position 252, die durch die Aminosäureanalyse als Asparagin(säure) identifiziert werden konnte. Die nächsten Aminosäuren (C-terminal) sind Isoleucin und Threonin, die Bindungsstelle entspricht also dem Schema N-X-T/S- einer N-glykosidischen Verknüpfung der Zuckerseitenkette mit der Aminosäure Asparagin (*JACKSON & HIRS, 1970*). Die Peptide aus den Spaltungen der funktionellen Einheit d, die die Kohlenhydratseitenkette enthielten, fielen durch großes

Molekulargewicht bei Trennungen durch Gelfiltration und große Hydrophilizität bei Trennungen durch die reversed-phase HPLC auf. Besonders auffällig war dies bei der Gelfiltration der tryptischen Spaltgemische von d 1. Hier bietet sich die Möglichkeit, die Molekulargewichte der eluierten Peptide T 11 und T 18/19 aus den Fraktionen I und II zu vergleichen. T 11 besitzt mit 47 Aminosäuren ein Molekulargewicht von etwa 5600 D, T 18/19 mit 16 Aminosäuren und der Zuckerseitenkette 5200 D. Bei der ersten Trennung der tryptischen Peptide von d 1 wurden beide Peptide in Fraktion I eluiert (Abb. 14), während bei der zweiten Trennung T 18/19 in I und T 11 in II eluiert wurde (Abb. 29 und 30). Geht man von einem konstanten Zucker Gehalt der funktionellen Einheit d aus, so bedeutet dies, daß die zweite Aufarbeitung beide Peptide besser trennte.

Bei der Sequenzierung der Peptide der funktionellen Einheit d wurden keine weiteren Stellen entdeckt, die Kohlenhydratseitenketten enthalten könnten. Daraus und aus der Tatsache, daß die Molekulargewichtsbilanz aus der Differenz T 11 (5600 D) - T 18/19 (1900 D Proteinanteil und 3300 D Kohlenhydratanteil ergibt 5200 D) etwa aufgeht, kann geschlossen werden, daß der gesamte Zuckeranteil an einer Stelle gebunden wird. Eine Kohlenhydratbindungsstelle wurde auch von VEREIJKEN et al. (1982) bei der Untereinheit a aus *Panulirus interruptus* festgestellt, dem einzigen Hämocyanin mit Kohlenhydratanteil, das bisher sequenziert wurde.

Das Hydrophilizitätsprofil, berechnet mit einem Computerprogramm nach LEVITT (1976), modifiziert von HOPP & WOODS (1981), zeigt Abb. 60. Hydrophile Sequenzabschnitte werden der Moleküloberfläche, die dem Lösungsmittel zugewandt ist, zugeordnet, während die hydrophoben Bereiche mehr im Molekülinneren liegen. Für die Einheit d sind diese Aussagen an den Spaltstellen von Trypsin bei der limitierten Spaltung überprüfbar. Bei der limitierten Spaltung ist das Hämocyaninmolekül noch nicht denaturiert, besitzt also seine ursprüngliche Faltung. Die Protease kann nur an der Oberfläche liegende Spaltstellen erreichen. In der funktionellen Einheit d sind dies drei Spaltstellen. Sie sind in ausgesprochen hydrophilen Regionen angesiedelt: im Bereich von Aminosäure 325 bis 336 liegt die Spaltstelle, die d 1 und d 2 entstehen läßt; auch die C-terminalen Aminosäuren haben stark hydrophilen Charakter (406-408). Methodebedingt (Mittelwertberechnung) sind für die ersten drei und die letzten zwei Aminosäuren keine Werte berechnet worden.

Betrachtet man aber deren Seitengruppen, so erkennt man, daß sie überwiegend hydrophilen Charakter haben (E-Y-R, E-R).

Einige der hydrophoben "Täler" im Profil sind deckungsgleich mit den Regionen, die beim Vergleich mit anderen Sequenzen im nächsten Abschnitt als mögliche Kupferbindungszentren diskutiert werden. Die "Täler" 59-73 und 88-99, getrennt durch einen hydrophilen "Berg", sind der Bereich (60-103), der mit Kupfer A bezeichnet wird und bei Molluskenhäemocyanin und Tyrosinasen homologisiert werden kann. Drei weitere hydrophobe "Täler" (172-184, 198-207 und 213-218) sind in einer Region, die - als Kupfer B bezeichnet - beim Vergleich von Arthropodenhäemocyaninen, Tyrosinasen und *Helix d* als zweites Kupferbindungszentrum diskutiert wird (172-219). Die besprochenen hydrophoben Sequenzabschnitte sind als Teile des postulierten aktiven Zentrums wahrscheinlich im Inneren des Moleküls angeordnet.

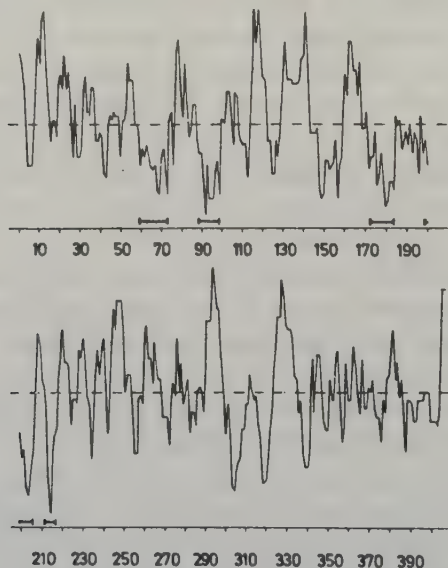


Abb. 60: Hydrophilizitätsprofil der funktionellen Einheit d nach LEVITT (1976), modifiziert von HOPF & WOODS (1981). Die hydrophoben "Täler", die mit den als Kupfer A und B bezeichneten Sequenzabschnitten übereinstimmen, sind gekennzeichnet.

Der Einsatz von Computerprogrammen ermöglicht es auch, Vorhersagen über die Sekundärstruktur aus der Primärstruktur eines Proteins zu erstellen. Ausgangspunkt von Vorhersagen sind Vergleiche von Röntgenstrukturanalysen mit Primärstrukturdaten (CHOU & FASMAN, 1978). Bei verschiedenen Aminosäuren konnten unterschiedliche Tendenzen zur Beteiligung an den Sekundärstrukturen α -Helix, β -Faltblatt, Reverse Turns und Coil festgestellt werden. Bei Anhäufung von Aminosäuren, die eine bestimmte Sekundärstruktur bevorzugt bilden, kann mit großer Wahrscheinlichkeit mit einer der erwähnten Sekundärstrukturen gerechnet werden, falls in diesem Abschnitt keine Aminosäuren vorkommen, die diese Struktur unter keinen Umständen unterstützen.

Der Wert der Vorhersagen ist, - abgesehen von der Vorhersagewahrscheinlichkeit, die unterschiedlich beurteilt wird - für strukturelle Eigenschaften von Proteinen begrenzt, da die Tertiärstruktur, die räumliche Anordnung der Proteinkette, für die Funktion eines Proteins von weit größerer Bedeutung ist. Bei den Berechnungen der Sekundärstruktur spielen Fernwirkungen keine Rolle.

Die Sekundärstrukturvorhersage der funktionellen Einheit d zeigt Abb. 61. Von besonderem Interesse sind die vorgeschlagenen Kupferbindungszentren (vgl. nächsten Abschnitt), die aus Vergleichen mit Arthropodenhäemocyaninen und Tyrosinasen abgeleitet wurden und die mit den Daten der Röntgenstrukturanalyse des Häemocyanins aus *Panulirus interruptus* verglichen werden können (Abb. 63 und Abb. 65).

Um den Wert einer Sekundärstrukturvorhersage abschätzen zu können, kann man die Übereinstimmung der Vorhersage für *Panulirus*-Häemocyanin (LINZEN, persönliche Mitteilung) mit der Röntgenstrukturanalyse vergleichen. Die Sekundärstrukturvorhersage von *Panulirus*-Häemocyanin wurde nur für einen Teilbereich von Untereinheit a durchgeführt (bis Pos. 383). Etwa 42 % der vorhergesagten α -Helix- und β -Faltblattstrukturen stimmen mit denen der Röntgenstrukturanalyse überein.

Tab. 7 zeigt eine Gegenüberstellung der Anteile an α -Helix- und β -Faltblattstrukturen für die Häemocyaninuntereinheiten aus *Panulirus interruptus* a (Röntgenstrukturanalyse), *Eurypelma californicum* d und e (beide Vorhersagen: REISINGER, 1985) und *Helix pomatia* d. Bei den Sekundärstrukturberechnungen werden hohe und niedrige Vorhersagewahrscheinlichkeiten unterschieden. Betrachtet man die addierten Vorhersagen, so erhält man α -Helixanteile von 38-45 % und β -Faltblattanteile von 20-26 %. Bei *Panulirus*-Häemocyanin be-

1	10	20	30	40	50
DAVTVAHVSRKDLDTLTAGEIESLRSAFLDIQQDHTYENIASFHGKPGLC					
BBB TThh					
51	60	70	80	90	100
QHEGHKVACSVSGMPTFPSSWHRLYVEQVEEALLDHGSSVAVPYFDWISPT					
hhhhhhhhBBBBBB BBBBBBBBBBBHHHHHHHHHtttttBBBBBBBBBB					
101	110	120	130	140	150
QKLPDLISKATVYNSREQRFDPNPFFSGKVAGEDAVTTTRDPQPELFNNNY					
TThhhhhh tthhhhhhhTTTT tthhhhhhhhhhhhhhhh BBBBBB					
151	160	170	180	190	200
FYEQALYALEQDNFDDFEIQFEVLHNAHLSWLGGHAKYSFSSLDYTAFD					
BBHHHHHHHHHtttHHHHHHHHHHHH hhhhhh tttt					
201	210	220	230	240	250
VFFLHHANTORLVAIVQELQRYRGLPYNEADCAINLMRKPLQPFQDKKLN					
BBBBB TtttHHHHHHHHHHHH Ttthhhhhhhhhhh hhhhhhhhh					
251	260	270	280	290	300
PRNITNIYSRPADTFDYRNHFHYEYDTLELNHQTVPQLENLLKRRQYER					
TtBBBBBBtt tttt ttt bbbbbbhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh B					
301	310	320	330	340	350
VFAGFLIHNNGLSADVTVYVCVPSGPKGKNDCCNHKAGVFSVLGGEELEMPF					
BBBBBBBBBTTT BBBBBBBTTTTTTTTTTTTttt BBBBBB B					
351	360	370	380	390	400
TFDRLYKLQITDTIKQLGLKVNNAASYQLKVEIKAVPGTLLDPHILPDPS					
BBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBB tthhhhhhhhhHttBBBBBBBBBTTT					
401	410				
IIFEPGTER					
TT					

Abb. 61: Vorhersage der Sekundärstruktur für die funktionelle Einheit d nach CHOU & FASMAN (1978). H, h, B, b, T und t zeigen α -Helix, β -Faltblatt und Turns mit hoher (Majuskel) bzw. geringer (Minuskel) Vorhersagewahrscheinlichkeit.

trägt der α -Helixanteil 34 %, der β -Faltblattanteil 28 %. Der Anteil der α -Helix- und β -Faltblattstrukturen ist in den betrachteten Hämocyaninen vergleichbar. Er unterscheidet sich von anderen Sauerstofftransportproteinen, die weit höhere α -Helixanteile besitzen (Hämoglobin 85 %, Hämerythrin 79 %).

Sekundärstruktur	<i>Pint a</i>	<i>Eury d</i>	<i>Eury e</i>	<i>Helix d</i>
α -Helix (H+h)	34 %	45 %	38 %	39 %
α -Helix (H)	-	17 %	18 %	12 %
β -Faltblatt (B+b)	28 %	20 %	22 %	26 %
β -Faltblatt (B)	-	20 %	22 %	20 %

Tab. 7: Vergleich der Anteile der Sekundärstrukturen α -Helix und β -Faltblatt von Untereinheiten verschiedener Hämocyanine; Sekundärstrukturvorhersagen nach CHOU & FASMAN (1978) bei *Eurypelma californicum* (*Eury d* und *e*) (RELSINGER, 1985) und *Helix pomatia* (*Helix d*), bei *Panulirus interruptus* (*Pint a*) aus der Röntgenstrukturanalyse abgeleitet (GAYKEMA et al., 1985), H und B stehen für hohe Vorhersagewahrscheinlichkeit; H+h und B+b für Summe von hoher und niedriger Vorhersagewahrscheinlichkeit.

3. Vergleich der Sequenz von Helix d mit Arthropodenhäemocyaninen

Schon während der Sequenzierung der funktionellen Einheit d wurde nach Homologien mit Arthropodenhäemocyaninen gesucht. Von besonderem Interesse waren Peptide, die zwei Histidinreste getrennt durch drei Aminosäuren aufwiesen (H-X-Y-Z-H), da dies ein Charakteristikum des aktiven Zentrums von Arthropodenhäemocyanin ist (GAYKEMA et al., 1984; LINZEN et al., 1985). Bei der Sequenzierung der mit der Protease aus *S. aureus* gespaltenen Peptide von CB 2 wurde eine Ähnlichkeit von CB 2 SP 6 mit dem als Kupfer B bezeichneten Teil des aktiven Zentrums der Arthropodenhäemocyanine gefunden. Vier Aminosäuren des nur sieben Schritte sequenzierten Peptids waren identisch, darunter zwei Histidinreste im gesuchten Abstand:



Dieses Peptid wurde dann aus der Spaltung von Fragment d 1 mit der Protease aus *S. aureus* isoliert und konnte durch Überlappung mit T 12 auf 39 Aminosäuren verlängert werden. Durch Einfügung von Lücken ließen sich weitere Aminosäuren finden, die bei den bisher sequenzierten Arthropodenhäemocyaninen an denselben Stellen plaziert waren.

Auch nach der vollständigen Sequenzierung der funktionellen Einheit d wurden keine weiteren Bereiche gefunden, die Ähnlichkeiten mit den Arthropodenhäemocyaninen aufwiesen. Abb. 62 zeigt einen Vergleich des Kupfer B Bereichs der Arthropodenhäemocyanine aus *Panulirus interruptus* (Untereinheit a), einem Vertreter der Crustaceen und *Eurypelma californicum* (Untereinheit e), einem Vertreter der Cheliceraten. In einem Bereich von 59 Positionen (Lücken eingerechnet) sind 10 Aminosäuren in allen Sequenzen identisch. An verschiedenen Positionen sind die Aminosäuren in ihren Eigenschaften ähnlich. Besondere Beachtung verdienen die markierten Histidinreste, die bei *Panulirus* als kupferbindend identifiziert wurden (GAYKEMA et al., 1984). Aufgrund dieser Ähnlichkeiten kann man auf eine gleiche Funktion dieses Bereiches als Kupferbindungsstelle bei *Helix* Häemocyanin wie bei den Arthropodenhäemocyaninen schließen.

Unterstützt werden die Ähnlichkeiten in dem Bereich des Kupfer B durch Einbeziehung der Daten aus der Röntgenstrukturanalyse von *Panulirus* Häemocyanin im Vergleich mit der Sekundärstrukturvorhersage nach CHOU & FASMAN (1978).

Der besprochene Bereich würde ein Kupferatom binden. Die Bindungsstelle des zweiten Kupferatoms, bei den Arthropodenhäemocyaninen in ähnlicher Weise strukturiert, aber mehr N-terminal angeordnet, ist bei der funktionellen Einheit *d* nicht vorhanden, muß also auf andere Weise konstruiert sein.

Die geringe Ähnlichkeit in der Sequenz von Arthropoden- und Molluskenhäemocyaninen wirft neues Licht auf die Verwandtschaft dieser in ihren Eigenschaften vergleichbaren, in ihrer Struktur so unterschiedlichen Sauerstofftransportproteine. Vorhergesagte Homologien von $60 \pm 10 \%$ (GHIRETTI et al., 1975; GHIRETTI MAGALDI & TAMINO, 1977) aus den Aminosäureanalysen erweisen sich als unzutreffend. Die vorliegenden geringen Homologien lassen den Schluß zu, daß sich bei Annahme eines gemeinsamen Vorgängermoleküls nur eine Region des kupferbindenden Bereichs (Kupfer B) konserviert hat, während das zweite Kupferatom von einem unterschiedlich aufgebauten Bereich gebunden wird.

4. Vergleich mit anderen kupferhaltigen Proteinen

Wie schon in der Einleitung erwähnt, werden die Tyrosinasen wegen spektroskopischer Ähnlichkeiten mit den Häemocyaninen als zumindest in der Struktur des aktiven Zentrums verwandte Proteine betrachtet (HIMMELWRIGHT et al., 1980; VAN HOLDE & MILLER, 1982). Die funktionellen Gemeinsamkeiten werden unterstützt durch Untersuchungen der tyrosinaseähnlichen Aktivität von Häemocyaninen. Diese Aktivität ist schon lange bekannt (BAGVAT & RICHTER, 1938), ihr wurde aber erst durch die Aufklärung der spektroskopischen Gemeinsamkeiten von Häemocyaninen und Tyrosinasen (HIMMELWRIGHT et al., 1980) neue Bedeutung zugeordnet. In einigen Arbeiten wurden Häemocyanine auf Tyrosinaseaktivität untersucht (SALVATO et al., 1983; NAKAHARA et al., 1983). Beide Untersuchungen fanden bei Cephalopodenhäemocyanin Tyrosinaseaktivität, NAKAHARA et al. (1983) fand beim Arthropodenhäemocyanin von *Tachypleus tridentatus* keine Aktivität.

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit war die Primärstruktur der Tyrosinase aus dem Pilz *Neurospora crassa* bekannt (LERCH, 1978), während der Arbeit kam die Sequenz der bakteriellen Tyrosinase aus *Streptomyces glaucescens* hinzu (HUBER et al., 1985), so daß sich die Gelegenheit bot, Sequenzvergleiche zunächst mit Teilen von *d* und dann mit der Gesamtsequenz von *d* anzustellen (SCHNEIDER et al., 1984, DREXEL et al., 1986a, LERCH et al., 1986).

Beim Vergleich der drei Sequenzen findet man nur zwei Regionen, die sich homologisieren lassen. Abb. 64 zeigt den Bereich, der schon mit den Arthropodenhäemocyaninen verglichen wurde (Kupfer B). Hier sind auch bei den Tyrosinasen zwei Histidinreste durch drei Aminosäuren getrennt. Mit der Sequenz von *d* sind mehr Aminosäuren identisch als beim Vergleich mit den Arthropodenhäemocyaninen, auch müssen weniger Lücken eingefügt werden, um ein "Alignement" zu erhalten (16 Identitäten bei 49 Positionen oder 33 %, 10 Identitäten bei 57 Positionen oder 18 % im Vergleich mit Arthropoden). Dieser Bereich könnte auch bei den Tyrosinasen für die Bindung eines Kupferatoms verantwortlich sein. Damit wären die drei mit * markierten Histidinreste an der Kupferbindung beteiligt.

PFIFFNER et al. (1981) haben für die *Neurospora* Tyrosinase insgesamt vier Histidine nach Versuchen zur Photoinaktivierung und Inaktivierung mit Katechol als an der Kupferbindung beteiligt vorgeschlagen. Zwei dieser Reste sind in dem in Abb. 64 dargestellten Teil der Sequenz lokalisiert und mit + gekennzeichnet. Ein Histidinrest ist an einer homologen Position, die bei der Röntgenstrukturanalyse vom Häemocyanin von *Panulirus* als ein kupferbindendes Histidin bestimmt werden konnte. Das zweite Histidin hat in den anderen verglichenen Sequenzen keine entsprechenden Partner.

In Abb. 65 ist ein weiterer Bereich dargestellt, in dem die beiden Tyrosinasen Ähnlichkeiten mit der Sequenz der Einheit *d* von *Helix pomatia* aufweisen. Dieser Teil der Sequenzen liegt N-terminal vom bisher betrachteten Kupfer B, es könnte sich um eine Region handeln, die, obwohl völlig verschieden wie bei Arthropodenhäemocyaninen aufgebaut, bei Molluskenhäemocyaninen und Tyrosinasen der Bindung des zweiten Kupferatoms dient. Der Bereich wird analog zu den Arthropodenhäemocyaninen als Kupfer A bezeichnet. Die identischen Aminosäuren (in Abb. 65 umrandet) tragen möglicherweise zur Ligandierung eines Kupferatoms bei. An den bisher besprochenen tatsächlichen oder möglichen Kupferbindungsstellen waren Histidinreste für die Bindung verantwortlich. In diesem Bereich befindet sich nur ein Histidinrest, der in drei Sequenzen identisch ist und damit für eine Bindungsfunktion in Frage kommt. Dieses Histidin ist mit * markiert. Eine große Anzahl der restlichen identischen Aminosäuren sind aromatischer Natur (5 von 14) oder geladen (3 von 14), sie könnten die Bindung des Kupferatoms unterstützen. Die Nähe von aromatischen Aminosäuren zu möglichen oder tatsächlich an der Kupferbindung beteiligten Histidinen ist auch in Abb. 62 und 64 beim C-terminalen der

drei markierten Histidine zu erkennen. Bei einem Vergleich der Umgebung dieses Histidins aus den Kupfer A und B Regionen von Arthropoden- und Molluskenhäemocyaninen sowie Tyrosinasen (Abb. 66) findet man, daß sich drei Aminosäuren C-terminal vom Histidinrest immer ein Phenylalaninrest befindet. Dieser konservierte Rest könnte eine besondere Rolle bei der Kupferbindung spielen.

F	F	W	V	H	<i>Panulirus a</i> Häemocyanin	Kupfer A
F	Y	Y	M	H	<i>Eurypelma e</i> Häemocyanin	Kupfer A
F	F	R	L	H	<i>Panulirus a</i> Häemocyanin	Kupfer B
F	Y	R	Y	H	<i>Eurypelma e</i> Häemocyanin	Kupfer B
F	F	L	H	H	<i>Helix d</i> Häemocyanin	Kupfer B
F	W	L	H	H	<i>Streptomyces</i> Tyrosinase	Kupfer B
F	W	L	H	H	<i>Neurospora</i> Tyrosinase	Kupfer B
F	P	S	W	H	<i>Helix d</i> Häemocyanin	Kupfer A
F	L	P	W	H	<i>Streptomyces</i> Tyrosinase	Kupfer A
F	I	T	W	H	<i>Neurospora</i> Tyrosinase	Kupfer A

Abb. 66: Vergleich der vier Aminosäuren C-terminal vom
- dritten identischen Histidinrest der tatsächlichen oder möglichen Kupferbindungszentren A und B bei Arthropodenhäemocyaninen und B bei Molluskenhäemocyanin und Tyrosinasen bzw.
- einzelnen identischen Histidinrest im Bereich Kupfer A bei Tyrosinasen und Molluskenhäemocyanin.

Die Lage der vergleichbaren Sequenzabschnitte Kupfer A und B (relativ zu N- und C-Terminus) in den drei Proteinen ist unterschiedlich (Abb. 67). Bei *Helix d*, dem mit 413 Aminosäuren längsten, ist Kupfer A und B in der ersten Hälfte (vom N-Terminus gesehen) des Moleküls lokalisiert, während bei den Tyrosinasen Kupfer A in der N-terminalen Hälfte und Kupfer B in der C-terminalen Hälfte liegt. Der Abstand der beiden kupferbindenden Zentren, gemessen an der Zahl der Aminosäuren, die in der Sequenz dazwischen liegen, ist bei *Helix d* mit 77 Reste am geringsten, während bei der *Streptomyces*-Tyrosinase 103 Aminosäuren dazwischen liegen und bei der *Neurospora*-Tyrosinase 124 Aminosäuren. Da bei den Tyrosinasen im aktiven Zentrum neben Sauerstoff auch Raum für Substratmoleküle sein muß, brauchen die Tyrosinasen eine flexiblere Struktur, die durch einen größeren Abstand erreicht werden kann. Der Vorschlag, daß der in Abb. 65 mit * gekennzeichnete Histidinrest an der Kupferbindung beteiligt ist, steht im Widerspruch zu den schon erwähnten

Helix pomatia

EYR

DAVTVASHVRKDLDTLTAGEIESLRS AFLD
IQQDHTYENIASFHGKPGLCQHEGHKVACS
VSGMPTFPSPHRLYVEQVEEALDHGSSVA
VPYFDVISP IQKLPDLISKATYYNSREGRF
DPNPFSSGKVGAGEDAVTTTRDPQPELFNNNY
FYEQALYALEQDNFDDFEIQFEVLHNAHLS
WLSGHAKYSFSSLDYTAFOVPFFLHHANTD
REUAIWQELQRYRGLPYNEADCAINLMRKP
LQPFQDKKLNPRNITNIYSRPADTFDYRNH
FHYEYDTLELNHQTVPQLENLLKRRQEYGR
VFAGFLIHNNGLSADVTVYVCVPSGPKGKN
DCNHKAGVFSVLGGELEMPFTFDRLYKLQI
TDTIKQLGLKVNNAAASYQLKVEIKAVPGTL
LDPHILPDPSIIFEPGTER

Neurospora crassa

STDIKFAITGVPTTPSSNGAVPLRRELRLD
QQNYPEQFNLYLLGLRDFQGLDEAKLDSYY
QVAGIHGMPFKPWAGVPSDTDWSQPGSSGF
GGYCTHSSILFITLHRPYLALYEQALYASV
QAVAQKFPVEGGLRAKYVAAKDFRAPYFD
VASQPPKGT LAFPESSLSSRTIQVVDVDGKT
KSINNPLHRFTFHPVNPSPGNFSAAWSRYP
STVRYPNRLPGASRDERIAPILADELASLR
NNVSLLLL SYKDFDAFSYMRWDPNTNPGDF
GSLEAVHNEIHRTSGNGHMSSLEVSADF
LFWLHNVNVDRLUSIWQDLNPNNSFMTPRPA
PYSTFVAQEGESQSKSTPLEPFWOKSAANF
WISEQVKDSITFGYAYPETQKWKYSSVKEY
QAAIRKSVTALYGSNVF

Streptomyces glaucescens

TVRKNQATLTADKRRFVA AVLELKRSGRY
DEFVTTNNAFIIGD TDAGERTGHRSPSELP
WHRRYLLEFERALQSV DASVALFYWDUSAD
RTARASLWAPDFLGGTGRSLDGRVMDGPFA
ASAENWPINVRVDGRAYLRRLSGTAVRELP
TRAEVESVLGMATYDTAPWNSASDGFRNHL
EGWRGVNLHNRVHVWVGSRMATGMSPNDV
FWLHHAYVOKLWAEWRHRHPGSGYLPAAGT
PDVVDLNDRMKFWNDTSPADLLDHTAHYTF
DTD

Abb. 67: Die Lage der vergleichbaren Sequenzabschnitte von *Helix d* und zwei Tyrosinasen (Kupfer A und B aus Abb. 64 und Abb. 65). Die identischen Aminosäuren in den drei Sequenzen sind gekennzeichnet.

Ergebnissen von PIFFNER et al. (1981) bei *Neurospora crassa*. Dort wurden zwei durch vier Aminosäuren getrennte Histidinreste (Position 188 und 193) dem aktiven Zentrum zugeordnet. HUBER et al. (1985) vergleicht diesen Sequenzbereich mit dem Kupfer A von Arthropodenhäemocyanin (*Eurypelma e*). Beide Histidine liegen dann aber nicht mehr - wenn man eine α -Helix wie in der Röntgenstrukturanalyse von *Panulirus* Häemocyanin annimmt - nach einer Umdrehung der Helix in einer Ebene, so daß sich Probleme in der Orientierung zum Kupferatom ergeben könnten. Histidinreste im Abstand von vier Aminosäuren treten bei der Tyrosinase aus *Streptomyces* nicht auf, die *Neurospora*-Tyrosinase ist in dieser Beziehung ein Sonderfall.

Neben den Tyrosinasen enthalten noch eine Reihe weiterer Enzyme Kupfer in ihrem aktiven Zentrum (SPIRO, 1981). Spektroskopische Daten lassen Häemocyanin, Tyrosinase, Laccase, Ceruloplasmin und Ascorbatoxidase in eine Gruppe einordnen, die binucleäre Kupferzentren enthält. Die drei letzten Proteine enthalten neben den binucleären Kupferzentren noch weitere Kupferatome, und gehören deshalb zur Gruppe der "blauen Oxidasen", zu denen noch Proteine wie Azurin, Steilacyanin und Plastocyanin zählen (GRAY & SOLOMON, 1981). Die Superoxiddismutase enthält neben einem Kupferatom ein Zinkatom im aktiven Zentrum (VALENTINE & PANTOLIANO, 1981).

Betrachtet man die vorhandenen Aminosäuresequenzen der erwähnten Kupferproteine, so findet man bei Ceruloplasmin (TAKAHASHI et al., 1986) zwei Histidinpaare, die durch drei Aminosäuren getrennt sind, jedoch keine weiteren Ähnlichkeiten. Für die bekannte Sequenz von Laccase scheint aufgrund von Homologien zu Plastocyanin, Azurin, Ceruloplasmin und Superoxiddismutase (BRIVING et al., 1980; DWULETT & PUTNAM, 1981) ein Histidinpaar mit Abstand drei Aminosäuren wahrscheinlich. Weitere Sequenzähnlichkeiten sind nicht vorhanden. Für Ceruloplasmin jedoch werden für das aktive Zentrum andere Aminosäuren angenommen (TAKAHASHI et al., 1983); neben einem Methionin- und einem Cysteinrest findet sich auch ein Histidinrest, der zu einem der oben erwähnten Histidinpaare gehört.

Für die Bindung des Kupfer-Zink-Paares bei der Superoxiddismutase sind sechs Histidinreste und eine Asparaginsäure vorgeschlagen worden, die in den Sequenzen aus einer Reihe von Organismen invariant sind (HERING et al., 1986). Diese Histidinreste sind in völlig verschiedener Art in der Sequenz angeordnet als bei den Häemocyaninen.

5. Vergleich mit Teilsequenzen von Hämocyanin aus *Paroctopus dofleini*

Beim Kongress "Invertebrate Oxygen Carriers" bot sich zum ersten Mal die Gelegenheit, die fast vollständige Sequenz der funktionellen Einheit d aus dem β -Hämocyanin von *Helix pomatia* mit Teilsequenzen der C-terminalen Domäne aus dem Hämocyanin eines weiteren Vertreters der Mollusken, *Paroctopus dofleini*, zu vergleichen (Abb. 68) (TAKAGI, 1986; DREXEL et al., 1986b). 278 Positionen konnten verglichen werden, wobei eine Übereinstimmung von 38 % an identischen Aminosäuren erzielt werden konnte. Zählt man isofunktionelle Aminosäuren dazu, erhöht sich der Grad der Übereinstimmung auf etwa 50 %. Von Bedeutung sind Vergleiche von Peptiden aus *Paroctopus*, die sich den Bereichen Kupfer A und B in der funktionellen Einheit d homologisieren lassen. Für den Bereich Kupfer A konnten solche Peptide gefunden werden, für Kupfer B jedoch nicht, da noch nicht alle Peptide sequenziert waren (TAKAGI, persönliche Mitteilung). Ein Vergleich des Bereichs Kupfer A mit der funktionellen Einheit d aus *Helix* und den beiden Tyrosinasen zeigt Abb. 69.

Aus der hohen Übereinstimmung der Sequenz der funktionellen Einheit d des Vertreters der Klasse Gastropoda *Helix pomatia*, im β -Hämocyaninmolekül in einer mittleren Position angeordnet, mit der C-terminalen Domäne aus dem Hämocyanin des Cephalopoden *Paroctopus dofleini* kann der Schluß gezogen werden, daß alle Molluskenhämocyanine in einer ähnlichen Weise aufgebaut sind. Für funktionelle Einheiten an gleichen Positionen kann ein höheres Maß an Übereinstimmung erwartet werden.

<i>H. p.</i>	6HKVACSVSGMPT	F	PSWHR	--	LYVEQVEEA	L	LHGGSSVA	-VP-	Y	FDWISPIQK
<i>P. d.</i>	ENGTAACGQMVT	F	P-NHRSTLHYTSYPLF	LL	TKGSHVG	-IPDY	QWTTWFAN			
<i>S. g.</i>	TDAGERTGHRSPS	F	LPWHR	--	RYLLEFERAL	QSVQASVA	-LP-	Y	QWWSAORTA	
<i>N. c.</i>	SGFGGYCTHSSIL	F	ITWHR	--	PYLALYEQAL	YASVQAVA	-AP-	Y	QWASQPPK	

Abb. 69: Vergleich von Sequenzen aus zwei Molluskenhämocyaninen (*Helix pomatia* und *Paroctopus dofleini*) und zwei Tyrosinasen (*Neurospora crassa* und *Streptomyces glaucescens*) im Bereich der möglichen Kupferbindungsstelle A. Identische Aminosäuren sind umrandet, isofunktionelle schattiert.

```

1   10   20   30   40
D A V T V A S H V R K D L D T L T A G E I E S L R S A F L D I Q Q D H T - - - Y E N I A S F H G K P
E A V R - G T I I R K N V N S L T P S I K E - L R D A M A K V Q A D D S T D G Y Q K I A S Y H G I P

50   60   70   80   90
G L C Q H E - - G H K V A C S V S G M P T F P S V H R - - L Y V E Q V E E A L L D H G S S V A V P -
- L C S H Y E N G T A Y A C G Q - - M V T F P - N H R S T L H Y T S Y P L F L L T K G S H V G I P D

100  110  120  130  140
Y F D W I S P I Q K L P D L I S K A T Y V N S R E Q R F D P N P F F S G K V A G E D A V - - T T R D
Y F D W T T W F A N L P V L V T E E K - D N S F - - - - - - - - - - - - - H H A V I D T T R S

150  160  170  180  190
P Q P E L F N N N Y F Y E Q A L Y A L E Q D N F O D F E I Q F E V L H N A L H S W L G G H A K Y S F
P R A Q L F D D P D K G K E I Q H E D R H L R Y D I

200  210  220  230
- S S L D Y T A F O P V F F L H H A N T O R L W A I W Q E L Q R Y R G L P Y N E A D C A I N L M R K
T T S L K I V S V V Q A L Q K Y R G L P Y N T A N C E I K L L T K

240  250  260  270  280
P L Q P F Q D K K L M P R M I T N I Y S R P A D T F D Y R N H F H Y E Y D T L E L N H Q T V P Q L E
A H S T G A T S F D Y H K Q M E

290  300  310  320  330
N L L K R R Q E Y G R V F A G F L I H N N G L S A D V T V Y V C V P S G P K G K N D C N H K A G V F
D A L V A K S F F Y R V F A G F L L R T I G Q V A D D C T S N F K

340  350  360  370  380
S V L G G E L E M P F T F D - R L Y K L Q I T D T I K Q L G L K V N N A A S Y Q L K V E I K A V P G
M F W A W D F R L F K V T I K

390  400  410
T L L D P H I L P D P S I I F E P G T K E R
G I D G H V L S D K

```

Abb. 68: Vergleich der Sequenz der funktionellen Einheit d des β -Hämocyanins von *Helix pomatia* (oben) mit Teilsequenzen aus der C-terminalen 45 K Domäne des Hämocyanins aus *Paroctopus dofleini* (unten). Identische Aminosäuren sind umrandet. (verändert nach DREXEL et al., 1986b)

6. Folgerungen für die Evolution der Hämocyanine

Die Sequenzierung der funktionellen Einheit *d* aus dem β_1 -Hämocyanin von *Helix pomatia* und Vergleiche der Sequenz mit Arthropodenhämocyaninen und Tyrosinasen sind ein wesentlicher Beitrag zur Klärung der Verwandtschaftsbeziehungen von verschiedenen kupferhaltigen Proteinen. Es konnte gezeigt werden, daß die funktionellen Einheiten von Hämocyaninen aus Gastropoden und Cephalopoden ein hohes Maß an Ähnlichkeit aufweisen. Diese Übereinstimmung ist ein deutlicher Hinweis auf eine monophyletische Entstehung der Molluskenhämocyanine. Ein "Urgen" eines Molluskenvorläufers, das die Fähigkeit hatte, für ein Protein zu kodieren, das zwei Kupferatome bindet, hat sich durch mehrfache Duplikation zu einem Gen entwickelt, das für Polypeptidketten mit sieben (Cephalopoden) bis acht (Gastropoden) funktionelle Einheiten kodiert. Sieben Einheiten in einer Polypeptidkette wurden vor kurzer Zeit bei Cephalopoden nachgewiesen (GIELENS et al., 1986; LAMY et al., 1986).

Die Übereinstimmung von Teilbereichen der Molluskenhämocyanine mit Sequenzen von Tyrosinasen, die wegen ihrer spektroskopischen Ähnlichkeiten mit Hämocyaninen schon als möglicherweise verwandte Proteine postuliert wurden (VAN HOLDE & MILLER, 1982), läßt den Schluß zu, daß sich die Molluskenhämocyanine aus tyrosinaseähnlichen Proteinen entwickelt haben. Tyrosinasen sind in unterschiedlichsten Organismen vertreten und besitzen in zwei bisher sequenzierten Fällen eine vergleichbare Proteinstruktur (HUBER et al., 1986).

Für die Verwandtschaft der Arthropodenhämocyanine mit den Molluskenhämocyaninen und Tyrosinasen läßt sich sagen, daß eine geringe Ähnlichkeit nur im Bereich des zweiten Kupferbindungszentrums (Kupfer B) besteht. Nimmt man die Tyrosinasen als ursprünglichere Proteine an, so können durch eine Verzweigung vor der Abspaltung der Molluskenhämocyanine die Arthropodenhämocyanine entstanden sein. Die Arthropodenhämocyanine haben dann im Laufe der Evolution die ursprüngliche erste Kupferbindungsstelle verloren und sie durch eine der zweiten ähnliche, mit zwei Histidinen getrennt durch drei Aminosäuren und einem dritten Histidin etwa 40 Aminosäuren C-terminal, ersetzt. Abb. 70 stellt einen Stammbau dar, der die möglichen Freignisse verdeutlichen soll.

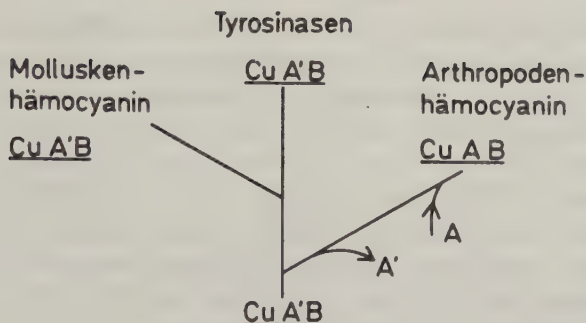


Abb. 70: Entwicklung der Hämocyanine aus Tyrosinasen, Kupfer A' bezeichnet den Teil des möglichen aktiven Zentrums, der nur bei Molluskenhämocyanin und Tyrosinasen auftritt und bei Arthropodenhämocyanin nicht gefunden wird, sondern durch einen dem Kupfer B ähnlichen Teil (Kupfer A) ersetzt ist.

Untersuchungen der Verwandtschaftsbeziehungen von Mollusken- und Arthropodenhämocyaninen wurden auf genetischer Ebene durch Hybridisierung einer synthetischen Oligonucleotidprobe aus 18 Desoxybasen durchgeführt (AVISSAR et al., 1986a; AVISSAR et al., 1986b). Die Probe wurde aus der charakteristischen Sequenz H-H-W-H-W-H des ersten Kupferbindungszentrums von Cheliceratenhämocyanin abgeleitet. Bei Hybridisierungsversuchen an m-RNA von Vertretern der Klassen Gastropoda (*Levantina hierosolima*), Cephalopoda (*Sepia officinalis*) und Chelicerata (*Leirus quinquestriatus*) wurden m-RNA Banden identifiziert, die die erwartete Größe der entsprechenden Hämocyaninuntereinheiten hatten.

Diese Ergebnisse stützen scheinbar die aus den Aminosäuresequenzdaten abgeleiteten Verwandtschaftsdaten, bei näherer Betrachtung sind jedoch Widersprüche zu entdecken. Nimmt man an, daß die aktiven Zentren der mit dem synthetischen Oligonucleotid untersuchten Mollusken in der Weise aufgebaut sind, wie sie in der vorliegenden Arbeit geschildert wurden, so kann die aus Cheliceraten Kupfer A abgeleitete Probe nicht an den in der m-RNA dem Mollusken Kupfer A entsprechenden Bereich hybridisieren, da keine Sequenzähnlichkeit vorhanden ist. Die andere Möglichkeit ist, daß das synthetische

Oligonucleotid an die zweite Kupferbindungsstelle hybridisiert hat. Hier ist Sequenzähnlichkeit durch die beiden Histidine, getrennt durch drei Aminosäuren, gegeben. Eine Hybridisierung der Oligonucleotid-Probe an diesen Bereich in der m-RNA ist überraschend, da bei Versuchen mit einem ähnlichen synthetischen Oligonucleotid in einer c-DNA Bank von *Eurypelma californicum* nur eine Hybridisierung mit der ersten Kupferbindungsstelle stattfand (VOIT & SCHNEIDER, 1986a; VOIT & SCHNEIDER, 1986b). Veränderte Hybridisierungsbedingungen können die Zahl der Bindungen des synthetischen Oligonucleotids erhöhen, jedoch steigt dann auch die Zahl der unspezifischen Anlagerungen, so daß der Wert der Aussagen der Versuche sinkt (VOIT, persönliche Mitteilung).

ZUSAMMENFASSUNG

1. Das Hämocyanin der Weinbergschnecke *Helix pomatia* besteht aus 20 Untereinheiten, die sich durch limitierte Trypsinolyse in acht funktionelle Einheiten spalten lassen. Die funktionellen Einheiten mit einem Molekulargewicht von etwa 50000 D binden je zwei Kupferatome und ein Sauerstoffmolekül.

2. Die funktionelle Einheit d des β_2 -Hämocyanins aus der Weinbergschnecke *Helix pomatia* wird bei der Trypsinolyse zum großen Teil noch in zwei Polypeptide (d 1 und d 2, d 1 N-terminal von d 2), die durch eine Cystinbrücke verbunden sind, gespalten (GIELENS et al., 1980). Die drei Peptide d, d 1 und d 2 wurden nach Reduktion und Carboxymethylierung getrennt. d wurde für die Isolierung von überlappenden Peptiden von d 1 und d 2 gesammelt. d 1 und d 2 wurden mit chemischen (Bromcyan, Säure) und enzymatischen (Trypsin, Protease aus *S. aureus*, Chymotrypsin und Endoproteinase Lys-C aus *Lysobacter enzymogenes*) Methoden gespalten. Die entstandenen Peptide wurden durch Gelfiltration über Sephacryl S-200, Biogel P 10 und TSK G 2000 SW vorgetrennt und durch reversed-phase Hochdruckflüssigkeitschromatographie rein dargestellt.

3. Mit einer manuellen Sequenzierungsmethode (CHANG et al., 1978) wurden alle Peptide ansequenziert. Ein großer Teil der Peptide wurde zusätzlich durch automatische Sequenzierung bestätigt und verlängert. Die Peptide d 1 und d 2 wurden durch überlappende Peptide vollständig sequenziert (d 1 330 und d 2 83 Aminosäuren). An der Position 253, der Aminosäure Asparagin, konnte eine Kohlenhydratseitenkette festgestellt werden. Durch Abbau mit Carboxypeptidase Y wurde als C-terminale Aminosäure von d 2 Arginin bestimmt.

4. Die Sequenzierung des aus dem gesammelten Peptid d nach Spaltung mit Bromcyan und Chymotrypsin isolierten überlappenden Peptids zwischen d 1 und d 2 mißlang. Die Überlappung zwischen d 1 und d 2 gelang erst nach Sequenzierung ohne vorherige Trennung eines Bromcyan- und Chymotrypsin-gespaltenen Peptidgemischs des aus vier funktionellen Einheiten (d, e, f und g) bestehenden Fragments P 2 (Molekulargewicht etwa 400000 D) nach Blockierungen mit *o*-Phthaldialdehyd.

5. Mit der Aminosäuresequenz der funktionellen Einheit *d* mit einer Länge von 413 Aminosäuren konnte zum ersten Mal die vollständige Sequenz eines Molluskenhäemocyanins vorgestellt werden.

6. Der Vergleich mit Arthropodenhäemocyaninen zeigte geringe Sequenzähnlichkeiten im Bereich der zweiten Kupferbindungsstelle (Kupfer B) des Arthropodenhäemocyanins. Homologien von 60 %, wie sie aus Vergleichen von Aminosäureanalysen vorhergesagt wurden, erwiesen sich als nicht zutreffend. Mit Tyrosinasen, kupferhaltigen Enzymen, konnten zwei Bereiche, einer entspricht dem Kupfer B der Arthropodenhäemocyanine, gefunden werden, die sich homologisieren lassen. Beide Bereiche werden als mögliche Kupferbindungsstellen diskutiert. Mit anderen Kupferproteinen konnten keine Ähnlichkeiten gefunden werden.

7. Bei partiell sequenzierten Peptiden aus der C-terminalen Einheit des Häemocyanins aus dem Cephalopoden *Paroctopus dofleini* konnte große Übereinstimmung mit der funktionellen Einheit *d* aus *Helix pomatia* festgestellt werden. Daraus wurde geschlossen, daß Cephalopoden- und Gastropodenhäemocyanin homolog und durch Genduplikation entstanden sind.

8. Für die Entstehung der Häemocyanine aus Tyrosinasenvorläufern wird ein Stammbaum vorgestellt.

AVISSAR, I., DANIEL, V., & DANIEL, E., (1986a):

Hc mRNA - A comparative study of the relationship of arthropod and mollusc hemocyanin at the mRNA level. In: Invertebrate Oxygen Carriers (LINZEN, B., ed.). Springer-Verlag, Heidelberg (im Druck).

AVISSAR, I., DANIEL, E., & DANIEL, V., (1986b):

Haemocyanin mRNA from arthropod and mollusc origin. Evidence for a multi-unit structure in mollusc haemocyanin mRNA. Biochem. J. 233, 253-257.

BAGVAT, K. & RICHTER, D. (1938):

Animal phenolases and adrenaline. Biochem. J. 32II, 1397-1406.

BAK, H.J., VEREIJKEN, J.M., SOETER, N.M., JEKEL, P.A., & BEINTEMA, J.J. (1986):

Primary structure of the *a* chain of *Panulirus interruptus* hemocyanin. In: Invertebrate Oxygen Carriers (LINZEN, B., ed.). Springer-Verlag, Heidelberg (im Druck).

BRIVING, C., GANDVIK, E.-K. & NYMAN, P.O. (1980):

Structural studies around cysteine and cystine residues in the "blue" oxidase fungal laccase. B. Similarity in amino acid sequence with ceruloplasmin. Biochem. Biophys. Res. Com. 93, 454-461.

CHANG, Y.H., BRAUER, D. & WITTMANN-LIEBOLD, B. (1978):

Micro-sequence analysis of peptides and proteins using 4-NN-dimethyl-aminoazobenzene 4'-isothiocyanate/isocyanate double coupling method. FEBS Letters 93, 205-214.

CHOU, P.Y. & FASMAN, G.D. (1978):

Prediction of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence. Adv. Enzymol. 47, 45-148.

CO, M.S., HODGSON, K.O., ECCLES, T.K., & LONTIE, R. (1981):

Copper site of mollusken oxyhemocyanins. Structural evidence from X-ray absorption spectroscopy. J. Am. Chem. Soc. 103, 984-986.

CRESTFIELD, A.M., MOORE, S. & STEIN, W.H. (1963):

The preparation and enzymatic hydrolysis of reduced and S-carboxymethylated proteins. *J. Biol. Chem.* 238, 622-627.

DIJK, J., BROUWER, M., COERT, A. & GRUBER, M. (1970):

Structure and function of hemocyanins. VII. The smallest subunit of α - and β -hemocyanin of *Helix pomatia*: size, composition, N- and C-terminal amino acids. *Biochim. Biophys. Acta* 221, 467-479.

DRAPEAU, G.R., BOILY, Y. & HOUMARD, J. (1972):

Purification and properties of an extracellular protease of *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.* 247, 6720-6726.

DRAPEAU, G.R., (1977):

Cleavage at glutamic acid with staphylococcal protease. In: *Meth. Enzymol.* (Hirs, C.H.W., Timasheff, S.N., eds.), Vol. XLVII, Academic Press, New York, 189-191.

DREXEL, R., SCHNEIDER, H.-J., SIGMUND, S., LINZEN, B., GIELENS, C., LONTIE, R., PREAUX, G., LOTTSPEICH, F. & HENSCHEN, A. (1986a):

Partial primary structure of *Helix pomatia* β -hemocyanin functional unit d. In: *Invertebrate Oxygen Carriers* (LINZEN, B., ed.). Springer-Verlag, Heidelberg (im Druck).

DREXEL, R., TAKAGI, T. & LINZEN, B., (1986b):

Sequence homologies of *Paroctopus dofleini* and *Helix pomatia* hemocyanin. In: *Invertebrate Oxygen Carriers* (LINZEN, B., ed.). Springer-Verlag, Heidelberg (im Druck).

DWULET, F.E. & PUTNAM, F.W. (1981):

Internal duplication and evolution of human ceruloplasmin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 2805-2809.

EDMAN, P. & HENSCHEN, A. (1975):

Protein sequence determination. In: *Protein sequence determination*, 2nd edn. (NEEDLEMAN, S.B., ed.). Springer Verlag, Berlin, 232-279.

ELLERTON, H.D., ELLERTON, N.F. & ROBINSON, H.A. (1983):

Hemocyanin - a current perspective. Prog. Biophys. molec. Biol. 41, 143-248.

ERIKSSON-QUENSEL I.-B. & SVEDBERG, T. (1936):

The molecular weights and the pH stability regions at the hemocyanins. Biol. Bull., 71, 498-547.

EYERLE, F. & SCHARTAU, W. (1985):

Hemocyanins in spiders, XX. Sulfhydryl groups and disulfide bridges in subunit d of *Eurypelma californicum* hemocyanin. Biol. Chem. Hoppe-Seyler, 366, 403-409

FREDERICQ, L. (1878):

Sur l'hemocyanine, substance nouvelle du sang de Poupe (*Octopus vulgaris*) C. R. Acad. Sci. (Paris) 87, 996-998.

GAYKEMA, W.P.J., HOL, W.G.J., VEREIJKEN, J.M., SOETER, N.M., BAK, H.J. & BEINTEMA, J.J. (1984):

3,2 A structure of the copper-containing, oxygen carrying protein *Panulirus interruptus* hemocyanin. Nature 309, 23-29.

GHIRETTI MAGALDI, A., TAMINO, G., & SALVATO, B. (1975):

The monophyletic origin of hemocyanins on the basis of the amino acid composition. Structural implications. Boll. Zool. 42, 167-179.

GHIRETTI MAGALDI, A. & TAMINO, G. (1977):

Evolutionary studies on hemocyanins. In: Structure and function of hemocyanins (Bannister, J., ed.). Springer Verlag, Heidelberg, New York, 122-127.

GIELENS, C., PREAUX, G. & LONTIE, R. (1975):

Limited trypsinolysis of β -hemocyanin of *Helix pomatia*. Characterization of the fragments and heterogeneity of the copper groups by circular dichroism. Eur. J. Biochem. 60, 271-280.

GIELENS, C., PREAUX, G. & LONTIE, R. (1977):

Structural investigations on β -hemocyanin of *Helix pomatia* by limited proteolysis. In: Structure and Function of Haemocyanin (BANNISTER, J.V., ed.), Springer-Verlag, Berlin, 85-94.

GIELENS, C., VERSCHUEREN, L.J., PREAUX, G. & LONTIE, R. (1980):

Fragmentation of crystalline β -haemocyanin of *Helix pomatia* with plasmin and trypsin. Location of the fragments in the polypeptide chain. Eur. J. Biochem. 103, 463-470.

GIELENS, C., VERSCHUEREN, L.J., PREAUX, G. & LONTIE, R. (1981a):

Localization of the domains in the polypeptide chain of β_c -hemocyanin of *Helix pomatia*. In: Invertebrate Oxygen-Binding Proteins: Structure, Active Site, and Function (LAMY, J. & LAMY, J., eds.), Marcel Dekker, New York, 295-303.

GIELENS, C., VERSCHUEREN, L.J., PREAUX, G. & LONTIE, R. (1981b):

Gel chromatographic separation of the haemocyanins of *Helix pomatia*. Further electrophoretic and immunological characterization of the components. Comp. Biochem. Physiol. 69B, 455-462.

GIELENS, C., BENOY, C., PREAUX, G. & LONTIE, R. (1986):

Seven functional units in the polypeptide chain of the hemocyanin of the cephalopod *Octopus vulgaris*. In: Vertebrate Oxygen Carriers (LINZEN, B., ed.). Springer-Verlag, Heidelberg (im Druck).

GRAY, H.B. & SOLOMON, E.I. (1981):

Electronic structures of blue copper centers in proteins. In: Copper proteins (SPIRO, T.G., ed). John Wiley & Sons, New York, 1-40.

GROSS, E. & WITKOP, B. (1962):

Nonenzymatic cleavage of peptide bonds: The methionine residues in bovine pancreatic ribonuclease. J. Biol. Chem. 237, 1856-1860.

HAYASHI, R., MOORE, S. & STEIN, W.H. (1973):

Carboxypeptidase Y from yeast. J. Biol. Chem. 248, 2296-2302.

HAYASHI, R. (1977):

Carboxypeptidase Y in sequence determination of peptides. In: *Methods in Enzymology* (HIRS, C.H.W. & TIMASHEFF, S.N., eds). N. Y. Acad. Press, 47, 84-93.

HEIRWECH, K., BORGINON, H. & LONTIE, R. (1961):

Separation and absorption spectra of α - and β -haemocyanin of *Helix pomatia*. *Biochim. Biophys. Acta* 48, 517-526.

HERING, K., KIM, S.-M.A., MICHELSON, A.M., ÖTTING, F., PUGET, K., STEFFENS, G.J. & FLOHE, L. (1985):

The primary structure of porcine Cu-Zn superoxide dismutase. Evidence for allotypes of superoxide dismutase in pigs. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, 366, 435-445.

HIMMELWRIGHT, R.S., EICKMAN, N.C. LU BIEN, C.D. LERCH, K., & SOLOMON, E.I. (1980):

Chemical and spectroscopic studies of the binuclear copper active site of *Neurospora* tyrosinase: Comparison to hemocyanins. *J. Am. Chem. Soc.* 102, 7339-7344.

HOPP, T.P. & WOODS, K.R. (1981):

Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78, 3824-3828.

HOUWARD, J. & DRAPEAU, R. (1972):

Staphylococcal protease: A proteolytic enzyme specific for glutamyl bonds. *Proc. Natl. Sci. USA* 69, 3506-3509.

HUBER, M., HINTERMANN, G. & LERCH, K. (1985):

Primary structure of tyrosinase from *Streptomyces glaucescens*. *Biochemistry*, 24, 6038-6044.

INGLIS, A., MCKERN, N., ROXBURGH, C. & STRIKE, P. (1980):

Cleavage of proteins at aspartic acid residues using dilute acid. In: Methods in Peptide and Protein Sequence Analysis (Birrr, C., ed.) (Proceedings of the 3rd International Conference on Solid Phase Methods in Protein Sequence Analysis), Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, 329-343.

JACKSON, R.L. & HIRS, C.H.W. (1970):

The primary structure of porcine pancreatic ribonuclease I. The distribution and sites of carbohydrate attachment. J. Biol. Chem. 245, 624-636.

KRATZIN, H., YANG, C., KRUSCHE, J.U. & HILSCHMANN, N. (1980):

Präparative Auftrennung des tryptischen Hydrolysats eines Proteins mit Hilfe der Hochdruckflüssigkeitschromatographie. Die Primärstruktur einer monoklonalen L-Kette vom K-Typ, Subgruppe I. Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 361, 1591-1598.

LAEMMLI, U.K. (1970):

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. Nature 227, 680-685.

LAMY, J., BIJLHOLT, M.M.C., SIZARET, P.Y., LAMY, J., & VAN BRUGGEN, E.F.J. (1981):

Quaternary structure of scorpion (*Androctonus australis*) hemocyanin. Localization of subunits with immunological methods and electron microscopy. Biochemistry 20, 1849-1856.

LAMY, J., LAMY, J.N., LECLERC, M., MILLER, K.I. & VAN HOLDE, K.E. (1986):

Preliminary results on the structure of *Octopus dofleini* hemocyanin. In: Vertebrate Oxygen Carriers (LINZEN, B., ed.). Springer-Verlag, Heidelberg (im Druck).

LERCH, K. (1978):

Amino acid sequence of tyrosinase from *Neurospora crassa*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 3635-3639.

LERCH, K., HUBER, M., SCHNEIDER, H.-J., DREXEL, R., & LINZEN, B. (1986):

Different origins of metal binding sites in binuclear copper proteins, tyrosinase and hemocyanin. *J. Inorg. Biochem.*, 26(3), 213-218.

LEVITT, A. (1976):

Simplified representation of protein conformations for rapid simulation of protein folding. *J. Mol. Biol.* 104, 59-107.

LINZEN, B., SOETER, N.M., RIGGS, A.F., SCHNEIDER, H.J., SCHARTAU, W., MOORE, M.D., YOKOTA, E., BEHRENS, P.Q., NAKASHIMA, H., TAKAGI, T., NEMOTO, T., VEREIJKEN, J.M., BAK, H.J., BEINTEMA, J.J., VOLBEDA, A., GAYKEMA, W.P.J. & HOL, W.G.J. (1985):

The structure of arthropod hemocyanins. *Science*, 229, 519-524.

LONTIE, R. (1977):

Hemocyanin as a copper complex. On the active site of molluscan haemocyanin and of tyrosinases. In *Structure and Function of Haemocyanins* (BANNISTER, J.V., ed.). Springer Verlag, Berlin, 150-155

LONTIE, R. (1983)

Components, functional units, and active sites of *Helix pomatia* haemocyanin. In: *Structure and Function of Invertebrate Respiratory Proteins* (WOOD, E.J., ed.). Life Chemistry Reports, Suppl. 1. Harwood Acad. Publishers, Chur, London, New York, 109-120.

LOTTSPREICH, F. (1980):

Identification of the phenylthiohydantoin derivatives of amino acids by high pressure liquid chromatography, using a ternary, isocratic solvent system. *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* 361, 1829-1834.

LOTTSPREICH, F., KELLERMANN, J., HENSCHEN, A., FOERTSCH, B., & MÜLLER-ESTERL, W. (1985):

The amino acid sequence of the light chain of human high-molecular-mass-kininogen. *Eur. J. Biochem.* 152, 307-314.

MARKL, J., KEMPTER, B., LINZEN, B., BIJLHOLT, M.M.C., & VAN BRUGGEN, E.F.J. (1981):

Hemocyanins in spiders, XVI. Subunit topography and a model of the quaternary structure of *Eurypelma californicum* hemocyanin. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 362, 1631-1641.

MELLEMA, J.E. & KLUG, A. (1972):

Quaternary structure of Gastropod haemocyanin. Nature, 239, 146-150.

MORSE, M.P., MEYHÖFER, E., OTTO, J.J., & KUZIRIAN, A.M. (1986):

Hemocyanin respiratory pigment in bivalve mollusks. Science, 231, 1302-1304

NAKAHARA, A. SUZUKI, S. & KINO, J. (1983):

Tyrosinase activity of squid hemocyanin. In: Structure and Function of Invertebrate Respiratory Proteins (WOOD, E.J., ed.). Life Chemistry Reports, Suppl. 1. Harwood Acad. Publishers, Chur, London, New York, 319-322.

NEMOTO, T. & TAKAGI, T. (1983):

Primary structure of *Tachypleus tridentatus* hemocyanin α chain. In: Structure and Function of Invertebrate Respiratory Proteins (WOOD, E.J., ed.). Life Chemistry Reports, Suppl. 1. Harwood Acad. Publishers, Chur, London, New York, 88-92.

NISHIKAWA, K. (1983):

Assessment of secondary-structure prediction of proteins. Comparison of computerized Chou-Fasman method with others. Biochim. Biophys. Acta 748, 285-299.

PIFFNER, E., DIETLER, C. & LERCH, K. (1981):

Coordination of the active site copper in *Neurospora* Tyrosinase. In: Invertebrate Oxygen-Binding Proteins: Structure, Active Site, and Function (LAMY, J. & LAMY, J., eds.), Marcel Dekker, New York, 541-551.

PISZKIEWICZ, D., LANDON, M. & SMITH, E.L. (1970):

Anomalous cleavage of aspartyl-proline peptide bonds during amino acid sequence determination. Biochem. Res Comm. 40, 1173-1178.

PREAUX, G. GIELENS, C., VERSCHUEREN, L.J., & LONTIE, R. (1981):

Immunological comparison of the hemocyanins of *Helix pomatia* and of the proteolytic fragments of the β_c -component. In: Invertebrate Oxygen-Binding Proteins: Structure, Active Site, and Function (LAMY, J. & LAMY, J., eds.), Marcel Dekker, New York, 197-205.

PREAUX, G. GIELENS, C., & LONTIE, R. (1983):

Immunological comparison of the functional units of β_c -hemocyanin of *Helix pomatia*. In Structure and Function of Invertebrate Respiratory Proteins (WOOD, E.J., ed.) Life Chemistry Reports, Suppl. 1. Harwood Acad. Publishers, Chur, London, New York, 125-128.

REDFIELD, A.C. (1934):

The hemocyanins. Biol. Rev., 9, 175-212.

REISINGER, P. (1985):

Zur Primär- und Sekundärstruktur des Hämocyanins der Vogelspinne *Eurypelma californicum*. Dissertation, Universität München.

SALVATO, B., JORI, G., PISAZZESE, A., GHIRETTI, F., BELTRAMINI, M. & LERCH, K. (1983):

Enzymic activities of type-3 copper pair in *Octopus vulgaris* hemocyanin. In: Structure and Function of Invertebrate Respiratory Proteins (WOOD, E.J., ed.). Life Chemistry Reports, Suppl. 1. Harwood Acad. Publishers, Chur, London, New York, 313-317.

SCHARTAU, W., SCHNEIDER, H.-J., STRYCH, W., EYERLE, F. & LINZEN, B. (1981):

Studies on the primary structure of *Eurypelma californicum* hemocyanin. In: Invertebrate Oxygen-Binding Proteins: Structure, Active Site, and Function (Lamy, J., & Lamy, J. eds.), Marcel Dekker, New York, 327-333.

SCHARTAU, W., EYERLE, F., REISINGER, P., GEISERT, H., STORZ, H. & LINZEN, B. (1983):

Hemocyanins in spiders, XIX. Complete amino acid sequence of subunit *d* from *Eurypelma californicum* hemocyanin, and comparison to chain *e*. Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 364, 1383-1409.

SCHNEIDER, H.-J., SCHARTAU, W., LINZEN, B., LOTTSPEICH, F. & HENSCHEN, A. (1980):

Hemocyanins in spiders, X. Limited proteolysis of chain *e* of *Eurypelma californicum* and partial sequence of two large fragments. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 361, 1211-1216.

SCHNEIDER, H.-J., ILLIG, U., MÜLLER, E., LINZEN, B., LOTTSPEICH, F. & HENSCHEN, A. (1982):

Hemocyanins in spiders, XVII. A presumptive active-site sequence of arthropodan hemocyanins. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 363, 487-492.

SCHNEIDER, H.-J., DREXEL, R., FELDMAIER G., LINZEN, B., LOTTSPEICH, F. & HENSCHEN, A. (1983):

Hemocyanins in spiders, XVIII. Complete amino-acid sequence of subunit *e* from *Eurypelma californicum* hemocyanin. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 364, 1357-1381.

SCHNEIDER, H.-J., DREXEL, R., SIGMUND, S., LINZEN, B., GIELENS, C., LONTIE, R., PREAUX, G., LOTTSPEICH, F. & HENSCHEN, A. (1984):

Partial amino acid sequence of *Helix pomatia* hemocyanin: Tyrosinase and hemocyanins have a common ancestor. In 1st Congr. Comp. Physiol. Biochem. Liège, 1984. A155-A156

SIGMUND, S. (1983):

Sequenzstudien an der Domäne *d* des Hämocyanins aus der Weinberg-schnecke *Helix pomatia* - Versuch einer Homologisierung mit Arthropodenhämocyaninen. Diplomarbeit, Universität München

SIEZEN, R.J. & VAN BRUGGEN E.F.J. (1974):

Structure and properties of hemocyanins. XII. Electron microscopy of the dissociation products of *Helix pomatia* α -hemocyanin: Quaternary structure. J. molec. Biol. 90, 77-89.

SPIRO, T.G. (1981):

Copper proteins. John Wiley & Sons, New York.

SWAMMERDAM, J. (1669):

Historia Insectorum Generalis ofte algemene verhandeling van de bloedeloose dierkens. Utrecht: van Dreunen.

TAKAGI, T. (1986):

Amino acid sequence of the C-terminal domain of octopus (*Paroctopus dofleini dofleini*) hemocyanin. In: Invertebrate Oxygen Carriers (LINZEN, B., ed.). Springer-Verlag, Heidelberg (im Druck).

TAKAHASHI, N., BAUMAN, R.A., ORTEL, T.L., DWULET, F.E., WANG, C.-C. & PUTNAM, F.W. (1983):

Internal Triplication in the structure of human ceruloplasmin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 115-119.

TAKAHASHI, N., ORTEL, T.L., & PUTNAM, F.W. (1986):

Complete sequence of human ceruloplasmin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (im Druck).

VALENTINE, J.S. & PANTOLIANO, M.W. (1981):

Protein-metal ion interactions in cuprozinc protein (Superoxid dismutase). In: Copper proteins (SPIRO, T.G., ed). John Wiley & Sons, New York, 291-358.

VAN BREEMEN, J.F.L., SCHUURHUIS, G.J., & VAN BRUGGEN, E.F.J. (1977):

Morphology of *Helix pomatia* hemocyanin and its subunits. In Structure and Function of Haemocyanins (BANNISTER, J.V., ed.). Springer Verlag, Berlin, 122-127

VAN BRUGGEN, E.F.J. (1983):

An electron microscopist's view of the quaternary structure of arthropodan and molluscan hemocyanins. In Structure and Function of Invertebrate Respiratory Proteins (WOOD, E.J., ed.). Life Chemistry Reports, Suppl. 1. Harwood Acad. Publishers, Chur, London, New York, 1-14.

VAN HOLDE, K.E. & MILLER, K.I. (1982):

Haemocyanins. Quart. Rev. Biophys. 15, No. 1, 1-129.

VEREIJKEN, J.M., SCHWANDER, E.H., SOETER, N.M. & BEINTEMA, J.J. (1982):

Limited proteolysis of the 94000 Dalton subunit of *Panulirus interruptus* hemocyanin; the carbohydrate attachment site. Eur. J. Biochem. 123, 283-289.

VOIT, R. & SCHNEIDER, H.-J. (1986a):

Cloning of *Eurypelma californicum* hemocyanin cDNA. In: Invertebrate Oxygen Carriers (LINZEN, B., ed.). Springer-Verlag, Heidelberg (im Druck).

VOIT, R. & SCHNEIDER, H.-J. (1986b):

Tarantula hemocyanin mRNA. In vitro translation, cDNA cloning and nucleotide sequence corresponding to subunit e. Eur. J. Biochem. (im Druck).

WOOD, E.J., CHAPLIN, M.F., GIELENS, C., DE SAELEER, J., PREAUX, G. & LONTIE, R. (1985):

Relative molecular mass of the polypeptide chain of β -haemocyanin of *Helix pomatia* and carbohydrate composition of the functional units. Comp. Biochem. Physiol. 82B, 179-186.

LEBENS LAUF

Name:	Raimund Franz Drexel
Geburtstag:	16. März 1957
Geburtsort:	Augsburg
Eltern:	Xaver Drexel und Paula Drexel, geb. Demeter,
Sept. 1963 bis Mai 1966	Löweneckschule, Augsburg
Mai 1966 bis Juli 1967	Volksschule vor dem Roten Tor, Augsburg
Sept. 1967 bis Juni 1976	Holbein-Gymnasium Augsburg, mathematisch-naturwissenschaftlicher Zweig
Juni 1976	Abitur
Nov. 1976 bis Dez. 1982	Studium der Biologie an der Universität München
	Hauptfach: Zoologie
	Nebenfächer: Genetik und Biochemie
	Diplomarbeit am Zoologischen Institut der Universität München unter Anleitung von Prof. Dr. Bernt Linzen, mit dem Thema:
	Zur Primärstruktur des Peptids e-Ch ₂₂ -29 aus der Untereinheit e des Hämocyansins aus der Vogelspinne <i>Eurypelma californicum</i>
seit März 1983	Doktorarbeit am Zoologischen Institut der Universität München unter Anleitung von Prof. Dr. Bernt Linzen, mit dem Thema:
	Die Aminosäuresequenz der funktionellen Einheit d aus dem β_c -Hämocyanin der Weinbergschnecke <i>Helix pomatia</i>

